

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie



Kateřina HABALOVÁ

**Populační genetika zimovišť druhového komplexu *Pipistrellus*  
*pipistrellus***

**Population genetics of *Pipistrellus pipistrellus* species complex  
hibernacula**

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Hulva, Ph. D.

Konzultanti: Mgr. Klára Demjanovičová

Mgr. Jan Demjanovič

Praha, 2020

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 6. 1. 2020

.....

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli Pavlu Hulvovi za cenné rady, připomínky a komentáře při tvorbě mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala mým konzultantům Kláře a Janu Demjanovičovým, kteří mi byli vždy ochotní poradit, když jsem se v něčem ztrácela. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému příteli a rodině za neutuchající morální podporu.

## ABSTRAKT

Tato práce se zabývá dvěma kryptickými druhy, netopýrem hvízdavým (*Pipistrellus pipistrellus*) a netopýrem nejmenším (*Pipistrellus pygmaeus*) žijícími v kontinentální Evropě v sympatrii. I přesto, že jsou oba druhy přes léto v Evropě hojné, na zimu se stahují na masová zimoviště, kterých je známých pouze několik. Bylo získáno celkem 233 jedinců obou druhů ze čtyř masových zimovišť z oblasti střední Evropy a Rumunska a pomocí nástrojů populační genetiky (analýza mitochondriálních sekvencí a jaderných mikrosatelitů) byla zkoumána druhová skladba a variabilita populací na zimovištích. Poprvé byla pomocí genetických nástrojů potvrzena dvě hibernakula s výlučným či podstatným masovým zastoupením netopýra nejmenšího. Nebyl odhalen žádný cytonukleární konflikt ani hybridní jaderný genotyp, to znamená nebyla potvrzena raná stádia hybridizace mezi oběma druhy. Podobná genetická struktura v obou typech markerů naznačuje značný překryv mezi swarmující a hibernující populací. Oproti *P. pygmaeus* byla u *P. pipistrellus* zjištěna vyšší genetická variabilita, přesto je genetická variabilita ve srovnání s jinými druhy poměrně nízká, což je pravděpodobně zapříčiněno silným genovým tokem, v případě *P. pygmaeus* možná recentnější kolonizací Evropy. Tomu by odpovídalo i zjištění genetických signatur silného populačního růstu právě u jedné z populací *P. pygmaeus*. Co se týče geografické distribuce variability, zatímco *P. pygmaeus* vykazuje homogenní populační strukturu v rámci téměř celé Evropy (a zkoumané hibernující populace značnou podobnost s většinou Evropy s výjimkou určité distance od apeninské a francouzské populace), *P. pipistrellus* vykazuje určitou geografickou strukturu a isolation by distance. Většina hibernujících jedinců spadá do středoevropského klastru, s výjimkou dvou jedinců z keltské a jednoho jedince ze západoevropské haploskupiny, zjištěných v Třebenicích. Toto zimoviště se tedy zřejmě nachází v oblasti kontaktní zóny výše zmíněných haploskupin a také potenciálně na rekolonizačním a migračním rozhraní. Analýza jaderných mikrosatelitů ukázala panmixii u obou druhů, což naznačuje, že samčí genový tok převládá nad samičí filopatrií u obou druhů. Další podrobnosti mohou být odhaleny zahrnutím širšího geografického rámce, genomických markerů a přímým studiem migračního chování.

**Klíčová slova:** populační biologie, masová zimoviště, mitochondriální DNA, mikrosatelity

## ABSTRACT

This thesis deals with two cryptic pipistrelle bat species, common pipistrelle (*Pipistrellus pipistrellus*) and soprano pipistrelle (*Pipistrellus pygmaeus*) living in sympatry in continental Europe. Although both species are abundant during summer in Europe, they spent winter in mass hibernacula and there is only limited knowledge about this period. In total, 233 individuals from four mass hibernacula were sampled in Central Europe and Romania. The species composition and population variability in winter hibernacula was examined by using the tools of population genetics (analysis of mitochondrial sequences and nuclear microsatellites). Two hibernacula with exclusive or partial mass representation of soprano pipistrelle were genetically confirmed for the first time. No cytonuclear conflict neither admixed nuclear genotype was detected, that means that early stage of hybridization between both species was not revealed. Similar genetic structure in both genetic markers indicate, that swarming and hibernating populations are substantially overlapping. Compared to the *P. pygmaeus*, higher genetic variability was found in *P. pipistrellus* populations, even though genetic variability is relatively low compared to other species. It can be caused by strong gene flow, in the case of *P. pygmaeus* it may be caused by more recent colonization of Europe. This case could correspond with detection of strong population growth in one population of *P. pygmaeus*. With regard to geographic distribution of variability, while *P. pygmaeus* has homogeneous population structure within almost whole Europe (and studied hibernating populations showed considerable similarity with most Europe except certain distance from Apennine and French population), *P. pipistrellus* shows certain geographic structure and isolation by distance. Most of the hibernating individuals belong to Central European cluster except two individuals from Celtic and one individual from West European haplogroup found in Třebenice. This hibernaculum is probably located in contact zone of previously mentioned haplogroups and is also potentially located on recolonization and migration borderline. Analysis of nuclear microsatellites shows panmixia in both species, indicating that parental gene flow prevails female philopatry in both species. Further details could be obtained by including wider geographic range, genomic markers and direct study of migration behaviour.

**Key words:** population biology, mass hibernacula, mitochondrial DNA, microsatellites

## Obsah

1.	TEORETICKÝ ÚVOD .....	8
1.1	Charakteristika druhu a jeho ekologie .....	8
1.2	Zformování komplexu .....	10
1.3	Každoroční cyklické chování .....	15
1.3.1	Migrace .....	16
1.3.2	Hibernace a masová zimoviště .....	18
1.4	Možná hybridizace mezi oběma druhy .....	19
2.	CÍLE PRÁCE .....	21
3.	MATERIÁL A METODY .....	22
3.1	Materiál .....	22
3.2	Metodika .....	22
3.2.1	Izolace DNA .....	22
3.2.2	Analýza mitochondriálního markeru .....	23
3.2.3	Pročištění .....	25
3.2.4	Analýza mikrosatelitových markerů .....	26
3.3	Analýza dat .....	28
3.3.1	Mitochondriální sekvence – zpracování chromatogramů .....	28
3.3.2	Analýza variability mitochondriálního markeru .....	29
3.3.3	Jaderné mikrosatelity – zpracování chromatogramů .....	30
3.3.4	Analýza variability mikrosatelitových markerů .....	31
4.	VÝSLEDKY .....	33
4.1	Analýza mitochondriální DNA .....	33
4.1.1	Určení haplotypů a původu jednotlivých kolonií .....	34
4.1.2	Popisné charakteristiky genetické variability .....	39
4.2	Analýza jaderných mikrosatelitů .....	41
4.2.1	Bayesiánská analýza .....	41
4.2.2	Odhad frekvence nulových alel .....	45
4.2.3	Genetická diverzita .....	46
5.	DISKUZE .....	48
5.1	Genetické markery .....	48
5.2	Hybridizace a introgrese .....	48
5.3	Druhové složení zkoumaných hibernujících populací .....	49
5.4	Třeбенice – sezónní srovnání .....	49
5.5	Fylogeografie hibernujících populací .....	50
6.	ZÁVĚR .....	54

7.	Seznam literatury.....	55
8.	Příloha.....	61

# 1. TEORETICKÝ ÚVOD

Letouni se kromě polárních oblastí vyskytují po celém světě, nicméně ne všude mohou získat po celý rok potravu. V oblastech, kde to možné není, se proto před zimou shromažďují na zimovištích a mohou vytvářet kolonie čítající i několik tisíc jedinců. Společně pak upadají do stavu zimní strnulosti (hibernace), kdy dojde k útlumu veškerých fyziologických procesů a tím přečkání nepříznivého období.

Tato práce se zabývá právě studiem masových zimovišť druhů *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774) a *Pipistrellus pygmaeus* (Leach, 1825), jejich populační biologií a prostorovou ekologií.

## 1.1 Charakteristika druhu a jeho ekologie

Komplex *Pipistrellus pipistrellus*/*Pipistrellus pygmaeus* patří do čeledi Vespertilionidae, což je vůbec největší čeleď řádu letounů, čítající něco přes 400 druhů a obývající téměř celý svět kromě nejchladnějších oblastí (Gaisler & Zima, 2018).

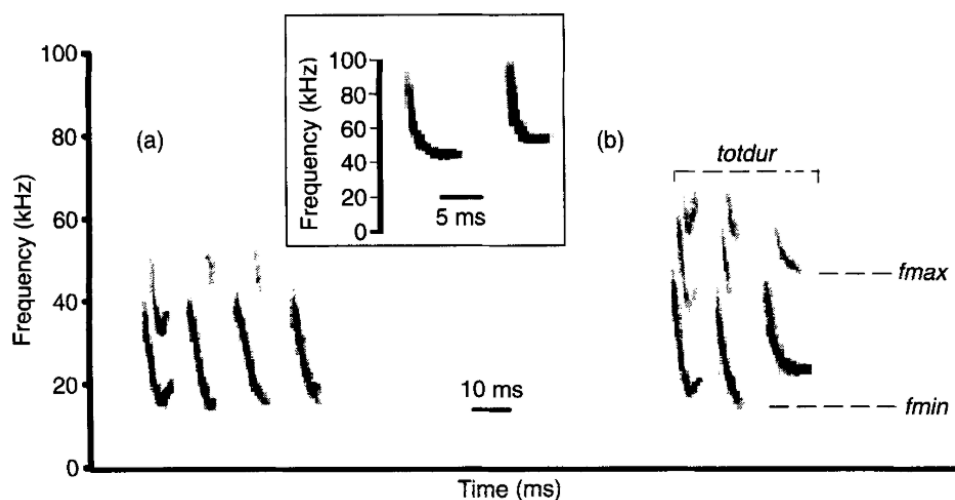
*P. pipistrellus* a *P. pygmaeus* jsou od sebe na první pohled morfologicky v podstatě nerozlišitelní (rozdíly jsou zřetelné pouze při využití detailní morfometrie) a dříve bylo předpokládáno, že se jedná o stejný druh. Nicméně byly objeveny určité rozdíly a zjistilo se, že se ve skutečnosti jedná o dva kryptické druhy.

Oba druhy se od sebe odlišují frekvencí echolokačních hlasů, kdy *P. pipistrellus* vydává hlasy o průměrné frekvenci 46 kHz, zatímco frekvence hlasů *P. pygmaeus* je 55 kHz (Jones & van Parijs, 1993). Druhy jsou podle rozdílnosti ve frekvencích označeny jako sonický typ 45 kHz a 55kHz (Racey et al., 2007) a za ancestrální znak je považována frekvence 45 kHz, která se vyskytuje u jedinců napříč celým areálem výskytu tohoto komplexu s výjimkou právě evropského *P. pygmaeus s. str.*, který jako jediný vydává hlasy o vyšší frekvenci (Hulva et al., 2004).

Oba druhy se liší i ve skladbě a frekvenci hlasů, pomocí kterých samci komunikují se samičkami a u dalších interakcí (například komunikace samice s mládětem, při hledání potravy a další). U *P. pygmaeus* se hlasy samců skládají z menšího počtu komponent (často ze tří) a mají vyšší frekvenci než hlasy *P. pipistrellus*, u něhož se standartně skládají z alespoň čtyř komponent o nižší



frekvenci. Stejným způsobem, jak v počtu komponent tak ve frekvenci, se u obou druhů liší hlasy využívané k ostatním interakcím. (Barlow & Jones, 1997)



Obr 1: Sonogramy hlasů samců využívaných při komunikaci se samicemi *P. pipistrellus* (a) a *P. pygmaeus* (b) (Barlow & Jones, 1997)

Další odlišnost se týká volby habitatu. *P. pygmaeus* by se v tomto ohledu dal považovat za habitatově náročnějšího i přesto, že jsou oba druhy v kontinentální Evropě sympatrické a často se vyskytují syntopicky. *P. pipistrellus*, ač preferuje listnaté lesy, má při volbě habitatu mnohem nižší nároky než *P. pygmaeus*, který si vybírá hlavně místa poblíž vody (Davidson-Watts et al., 2006).

Volba habitatu pak souvisí i se skladbou potravy, kterou netopýři přijímají. I přesto, že oba druhy se živí převážně zástupci z řádu Diptera a Lepidoptera, složení jejich stravy koreluje s volbou habitatu. *P. pipistrellus* se živí hmyzem, který se vyskytuje napříč různými stanovišti (velký podíl má v jeho stravě oproti *P. pygmaeus* například čeleď *Psychodidae* – kotulovití), zatímco *P. pygmaeus* se živí převážně na hmyzu vyskytujícím se v blízkosti akvatického prostředí (například čeledi *Chironomidae* – pakomárovití, *Ceratopogonidae* – pakomárcovití) (Barlow, 1997). Navíc bylo zjištěno, že *P. pipistrellus* se živí potravou větší a že s tím koreluje i velikost jeho lebky, která je větší než u *P. pygmaeus* a má delší spodní čelist a delší horní špičáky (Barlow et al., 1997).

Oba druhy se odlišují i ve volbě míst k páření. Zatímco u *P. pipistrellus* tvoří teritoria jednotlivých samců hustou síť míst, často i v městských oblastech v okolí

zimovišť (Sachteleben & von Helversen, 2006), u *P. pygmaeus* se jedná o teritoria rozptýlená, mnohdy v okolí nížinných lesů poblíž míst mateřských kolonií (Bartonička & Řehák, 2004).

Mezi oběma druhy je i několik fenotypových odlišností, které ale nejsou vždy stoprocentní, nicméně pro základní rozlišení obou druhů jsou dostatečné. Jedná se například o rozdíly v morfologii lebky (Barlow et al., 1997; Evin, Horáček, & Hulva, 2011), odlišný průběh žilek v křídle (Herdina et al., 2014; Pavlinić, Tvrtković, & Holcer, 2008) nebo rozdílná morfologie bakula u samců (Herdina et al., 2014).

Poslední odlišností je samozřejmě genetická rozdílnost, která mezi oběma druhy činí zhruba 11% (Barratt et al., 1997). Značné rozdíly jsou i co se týče variability v rámci druhu, *P. pipistrellus* má oproti *P. pygmaeus* mnohem variabilnější mtDNA s více mutacemi, což je pravděpodobně zapříčiněno historií vývoje obou druhů (Hulva et al., 2010).

## 1.2 Zformování komplexu

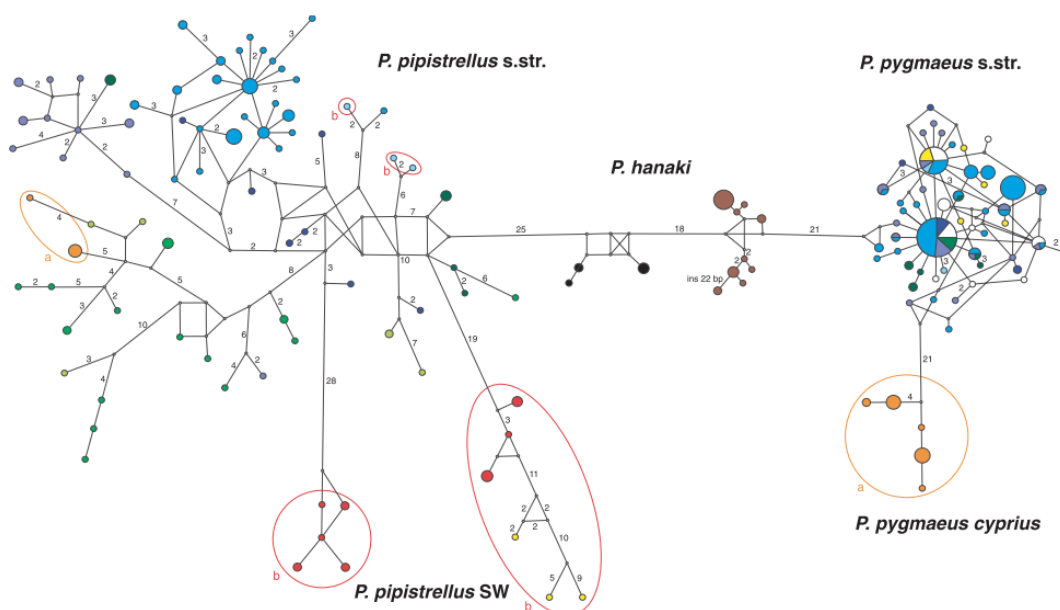
Evropský kontinent si během svého vývoje prošel různými stádii, které jej utvořily do dnešní podoby a jedním z významných bodů jeho vývoje, i z hlediska zformování námi studovaného netopýřího komplexu, byla Messinská salinitní krize v období před 5.96 – 5.33 miliony let (Krijgsman et al., 1999). V tomto období docházelo v oblasti Mediteránu k tektonickým a glacio-eustatickým změnám, což vyústilo až k přehrazení Gibraltarského průlivu a oddělení Středozemního moře od Atlantského oceánu a extrémní aridizaci oblasti. K tomuto ději nicméně nedošlo pouze jednou a během pozdního miocénu se Gibraltarský průliv zavíral a otevíral opakovaně, teprve na začátku pliocénu došlo k jeho permanentnímu otevření (Hsü, Ryan, & Cita, 1973). Tento bouřlivý vývoj oblasti měl za následek rozdělení areálů mnoha druhů a jejich vývoj v alopatrii.

První potvrzení, že se v Evropě nevyskytuje pouze *P. pipistrellus*, ale dva kryptické druhy, přinesla práce skupiny Barratt, Deaville, Burland, & Bruford z roku 1997. Na základě studia echolokačních hlasů vzešla hypotéza, že nejde o hlasy vydávané pouze jedním druhem netopýra a porovnáním 630 bp dlouhého úseku cytochromu *b* u několika jedinců z obou skupin byla tato hypotéza potvrzena.

Detailnějším navzorkováním oblasti střední Evropy a Mediteránu a následnou genetickou studií na 402 bp dlouhém úseku cytochromu *b* v práci Hulva et al., 2004, bylo rozdělení na dva clady (clade I a clade II) nejen že potvrzeno, ale bylo odhaleno, že situace v komplexu je ještě o něco složitější.

Celý komplex totiž zahrnuje malé odlišné demy žijící v alopatrii v oblasti Mediteránní pánve na jejích ostrovech a poloostrovech a dva kontinentální blízce příbuzné druhy žijící v sympatrii napříč téměř celou oblastí západního palearktu. Za oblast původu obou druhů je považováno jižní Středomoří (severní Afrika), kde je diverzita nejvyšší. V této oblasti došlo před 4,1 – 3,1 miliony let k prvnímu rozdělení skupiny na dva hlavní clady – východní a západní. Další štěpení skupiny probíhalo následovně – před cca 2,1 – 1,8 miliony let došlo k oddělení libyjské fyloskupiny a *P. pygmaeus s. str.* v oblasti východního Mediteránu. Další štěpení probíhalo před 1,6 – 0,9 miliony lety v západním Středomoří a došlo k oddělení marocké linie a *P. pipistrellus s. str.*. Před 0,8 miliony lety začala probíhat kolonizace Evropy (a později i Asie) *P. pipistrellus s. str.* iberskou trasou a před 0,25 miliony let i *P. pygmaeus s. str.* východomediterránní trasou. (Hulva et al., 2004)

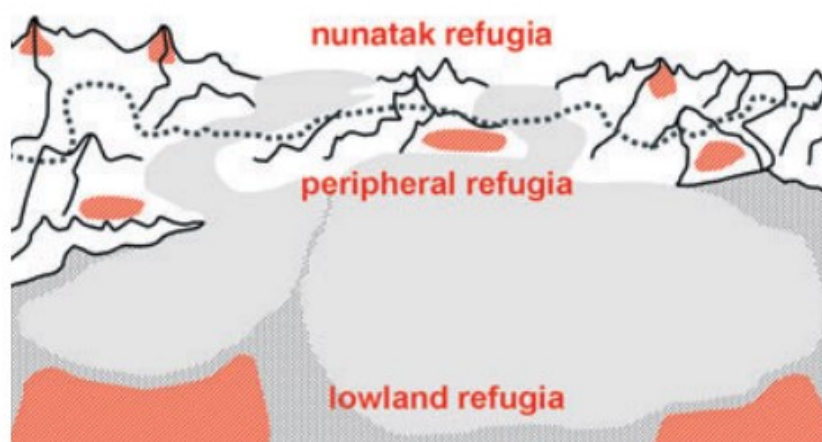
Celý komplex by se tedy dal rozdělit na dvě části – dva geneticky uniformnější sympatrické druhy obývající oblast západního palearktu (*P. pipistrellus s. str.* – západní clade II, *P. pygmaeus s. str.* – východní clade I) a jižní část komplexu zahrnující celou oblast Mediteránu s netopýry geneticky odlišnějšími, žijícími spíše v alopatrii. Kromě dvou výše zmíněných zde žijí i zástupci druhu *Pipistrellus hanaki* a poddruhu *Pipistrellus pygmaeus cyprius*. (Hulva et al., 2010)



Obr. 2: Haplotypová síť komplexu *Pipistrellus pipistrellus* založená na sekvencích mitochondriální D-loop (Hulva et al., 2010)

Evropské temperátní či teplomilné druhy se během dob ledových musely přizpůsobit klimatické situaci a většina jich toto nepříznivé období přežívala v refugiích. Za evropské refugium byla vždy považována právě oblast Mediteránu, jeho poloostrovy a ostrovy, na čemž byly založeny i výše zmíněné studie a situace v komplexu byla nahlížena pouze z této perspektivy. Nyní se ukazuje, že kromě mediteránních refugií mohla během posledního glaciálního maxima (před 24 – 14,6 tisíci lety) existovat i refugia na severu či severozápadě Evropy. Jednat by se mohlo například o refugia ve Velké Británii, Irsku, Belgii nebo Norsku (Stewart & Lister, 2001). Jako další možná kryptická refugia jsou pak nahlíženy i horské oblasti – Karpaty, Ural či Kavkaz (Schmitt et al., 2007; Sommer & Benecke, 2004).

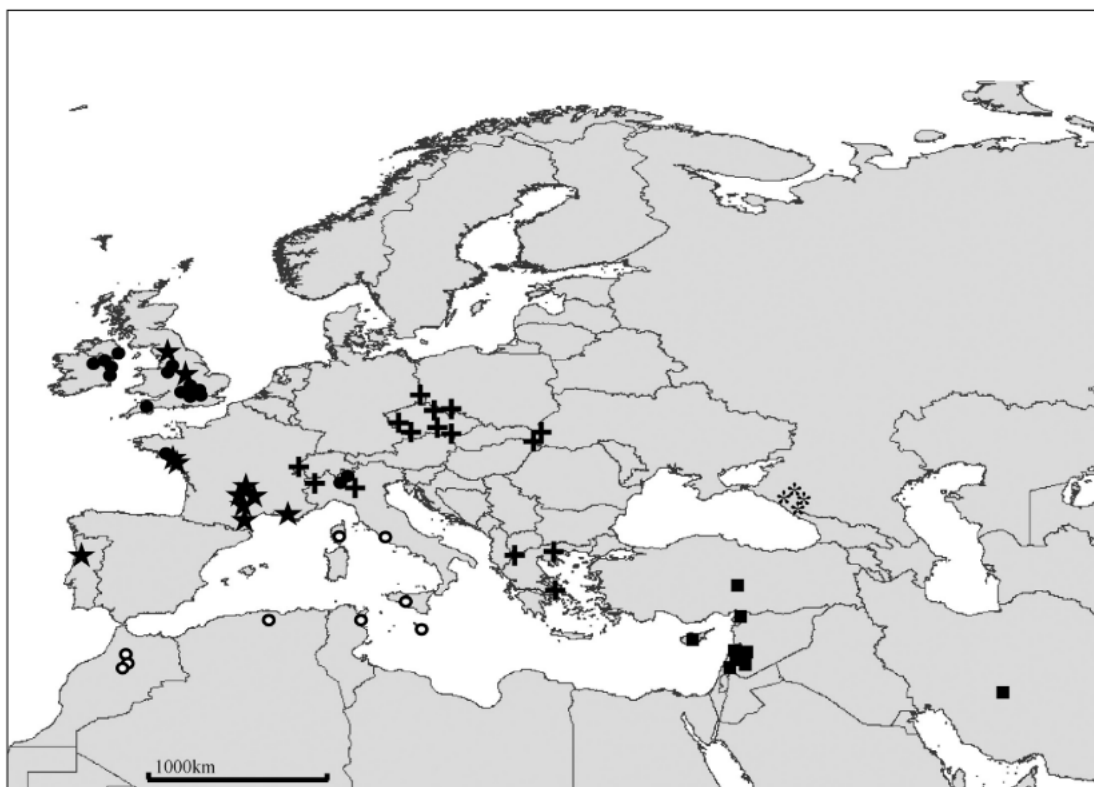
I přesto, že se jedná o oblasti poměrně dost na severu či o pohoří, mohla mít tato místa své vlastní mikroklima, které živočichům vyhovovalo a nepotřebovali se tedy přesouvat jižněji. Vhodným refugiem se tak mohlo stát například údolí, hluboce zaříznuté mezi okolními skalami, což vytvářelo perfektní prostředí s vlastním mikroklimatem (Stewart & Lister, 2001). Další místa se svým specifickým mikroklimatem mohla být i součástí horských oblastí či oblastí k nim přilehlých viz obr. 3 (Holderegger & Thiel-Egenter, 2009).



Obr. 3: Tři typy horských refugií – nunatak refugia (refugia v oblasti úplných vrcholů hor, nad ledovci), peripheral refugia (refugia na periferiích pohoří – ležela na hranicích horského systému, v místech pod úrovní permanentního výskytu sněhové pokrývky, ale nad ledovci), lowland refugia (nížinná refugia – ležela v oblasti přilehlých podhorských nížin); červeně jsou vyznačena refugia, světle šedě je vyznačen ledovec, který postupuje dále do údolí (tmavě šedá), přerušovanou čarou je vyznačena linie permanentního výskytu sněhové pokrývky (Holderegger & Thiel-Egenter, 2009).

Existence extra-mediterránních, středoevropských, severoevropských či horských, refugií je potvrzena pro mnoho druhů, například pro norníka rudého (Defontaine et al., 2005), bělozubku šedou (Dubey et al., 2006), zmiji obecnou (Ursenbacher et al., 2006) a mnoho dalších. Podle studie Boston et al., 2014 by tato extra-mediterránní refugia mohla být refugii i pro druh našeho zájmu *P. pipistrellus* s. str.. Jednat by se mohlo o místa ve východní a západní Evropě, jako pravděpodobná oblast severního refugia pro tento druh se jeví okolí Kavkazu a Černého moře.

Tato teorie je podpořena diverzitou jednotlivých haploskupin. Podle Hewitt, (2000) je diverzita nejvyšší právě v místě refugií. Nicméně při zkoumání západních a keltských haploskupin (viz Obr. 4) bylo zjištěno, že ačkoliv západní haploskupina dominuje ve Francii, diverzita v rámci skupiny je velmi vysoká i například v Irsku. Stejně tak keltská haploskupina, která je například v Itálii poměrně vzácná, má vysokou diverzitu na Britských ostrovech. Tento jev tedy může souviset buď s rekolonizací těchto oblastí z jižních refugií nebo s existencí extra-mediterránních refugií.



Obr. 4: Mapa distribuce haploskupin *Pipistrellus pipistrellus* SW a *P. pipistrellus* s. str.; černá kolečka znázorňují keltskou haploskupinu, černé hvězdy západoevropskou haploskupinu, černé kříže střeoevropskou haploskupinu, hvězdičky kavkazskou haploskupinu, černé čtverce blízkovýchodní haploskupinu a bílé kruhy *P. pipistrellus* SW (Boston et al., 2014)

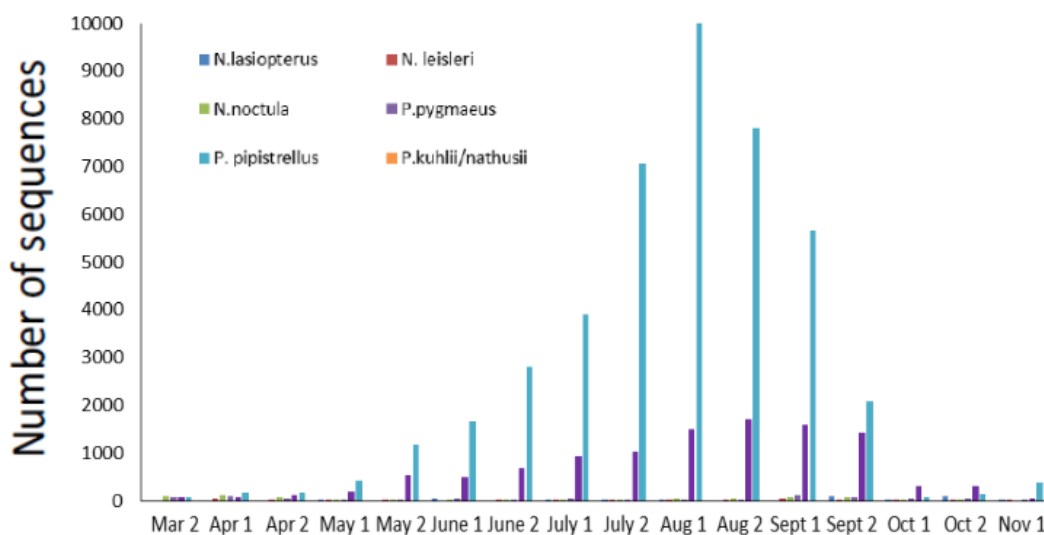
V prvním případě dochází k jevu tzv. „gene surfing“ (Hallatschek & Nelson, 2008). Tento jev souvisí s počáteční nízkou diverzitou v nově kolonizované oblasti (bottleneck efekt), kdy ale tento nízký počet jedinců, tzv. „pionýři“ nově vznikající populace, je mnohem úspěšnější při předávání genů budoucím generacím. Stejně tak jejich potomci mají tendenci se stát pionýry další generace a tak dále. Tyto geny pionýrů tedy mají vysokou pravděpodobnost dosáhnout vysoké frekvence v populaci tím, že se svezli na této prvotní vlně, proto gene surfing. (Edmonds et al., 2004; Hallatschek & Nelson, 2008)

Druhé vysvětlení vzniku vysoké diverzity v haploskupinách je spjato právě s existencí extra-mediterránních refugií. Tato refugia jsou potvrzena pro jiné druhy a *P. pipistrellus* s. str. se řadí mezi poměrně odolné netopýry, dobře přizpůsobené těmto drsnějším podmínkám, vyskytující se napříč širokým spektrem různých habitatů (Boston et al., 2014). *P. pygmaeus* takto přizpůsobivý není, ale je naopak považován za více migratorní druh (Bryja et al., 2009). Avšak co se týče výše

zmiňovaných kryptických refugií v severnějších oblastech, nebyla zatím pro námi zkoumané druhy stoprocentně potvrzena a celá situace bude potřebovat další studium.

### 1.3 Každoroční cyklické chování

U pipistrelloidních netopýrů funguje typický, každoročně se opakující cyklus, který souvisí se životem v temperátní oblasti. Po několika zimních měsících, které netopýři stráví v hibernaci, se samci a samice oddělí. Samice na jaře porodí mlád'ata a starají se o ně, zatímco samci žijí samotářským životem. Poté, co samice mlád'ata odstaví, opustí letní kolonie a přesouvají se i s mladými netopýry směrem k zimovištím. Během těchto přesunů se samice setkávají se samci, kteří čekají podél jejich tahových cest nebo v okolí zimovišť a dochází mezi nimi k páření. (Sachteleben & von Helversen, 2006) Vlivem těchto intenzivních přesunů z letních kolonií na zimoviště se v populaci udržuje velmi intenzivní genový tok (Bryja et al., 2009).



Obr. 5: Záznam aktivity migratorních netopýrů na lokalitě v Třebenicích zaznamenané během bioakustického měření (Bartonička, Miketová, & Hulva, 2019)

U netopýrů druhu *P. pipistrellus* se vyskytuje během období podzimních přeletů zvláštní typ chování. Jedná se o takzvané invazivní chování, kdy mnoho netopýrů (desítky až stovky) provádí invaze do budov ve městech poblíž jejich

zimovišť (viz Obr. 6 v kapitole 1.3.2). Časté invaze byly zaznamenány například v Košicích na Slovensku, které se nacházejí poblíž jeskyně Erňa patřící do Slovenského krasu, která je známá právě jako jedno z masových zimovišť. Zatím nebyl objeven žádný jednoznačný důvod tohoto chování, navíc tyto invaze často končí smrtí invadujících jedinců, protože nejsou schopni najít cestu ven z budovy a zemřou hladu. (Nusová et al., 2019)

Podle studie Nusová et al., (2019) se toto chování objevuje hlavně u mladých, nezkušených jedinců. Po odstavení od mateřského mléka se společně s matkami přesouvají na místa swarmingu a směrem k zimovištím. Bez vedení zkušených samic by se tam mladí jedinci nikdy nedostali. Invaze tedy mohou být výsledkem jejich snahy prozkoumávat okolí, jelikož při nalezení invadované budovy vždy převažovali mladí netopýři. Objeveno bylo pokaždé i několik dospělých samic, což je pravděpodobně způsobeno tím, že uvěznění netopýři vydávají sociální hlasy a samice, které poslouchají, je zachytí a nechají se vlákat do pasti taktéž (Voigt-Heucke, Zimmer, & Kipper, 2016).

Další možností, proč jsou mladí jedinci často nalezeni mrtví v budovách, by mohl být právě jejich věk. Jsou teprve několik dní odstavení od mateřského mléka, mají malé zásoby tuku, což jim může znemožnit dosažení zimoviště. (Nusová et al., 2019)

### 1.3.1 Migrace

Genetická variabilita netopýřů může být ovlivněna mnoha faktory jako například sezónní migrací, geografickými bariérami, či procesy co se odehrály v minulosti (Tamsin M. Burland & Worthington, 2001). U migrujících druhů je předpokládána genetická struktura velice nízká, což je způsobeno genovým tokem na velké vzdálenosti. Naopak u „sedentárních“ (nemigrujících) druhů je předpokládáno, že jsou populace geneticky více strukturované. (Burland et al., 1999; Rivers et al., 2005)

U netopýřů je často pozorovaný jev samičí filopatrie, která se projevuje zejména v populační struktuře mitochondriální DNA, kterou je proto vhodné kombinovat s biparentálně děděnými markery, kde se může projevit i genový tok způsobený samci (Castella et al., 2001).



I přesto, že oba druhy našeho zájmu se řadí mezi jedny z nejběžnějších v Evropě, otázka, zda se jedná o migratorní či spíše sedentární druhy, nemá jasnou odpověď. Svého času jediná studie, soustředící se na tuto problematiku (Racey et al., 2007), byla prováděna na Britských ostrovech a i přesto, že bylo zjištěno, že překonání mořské bariéry mezi Evropou a Británií by nemělo netopýrům činit potíže (Ahlén et al., 2009), může být britská populace ovlivněna právě její ostrovní pozicí (Bryja et al., 2009). Navíc jsou popsány určité rozdílnosti mezi netopýry žijícími na ostrovech a na kontinentu (například u druhu *Nyctalus leisleri* je popsáno rozdílné úkrytové chování – Ruczyński & Bogdanowicz, (2005) vs. Shiel & Fairley, (1999)). To tedy naznačuje, že populace z různých částí areálu výskytu se mohou odlišně chovat i co se týče migrace (Bryja et al., 2009).

Podle studie Bryja et al., (2009) byla mezi mateřskými koloniemi kontinentální Evropy zjištěna extrémně nízká genetická diferenciace, což naznačuje intenzivní genový tok. To může být způsobeno dvěma jevy, buď dlouhými migracemi mezi mateřskými koloniemi a zimovišti spojenými s pářením (například u druhu *Nyctalus noctula* – Petit et al., 2006) a/nebo disperzí na velké vzdálenosti alespoň jednoho z pohlaví (která se vyskytuje například u druhu *Myotis myotis* – Castella et al., 2001).

První varianta předpokládá, že alespoň část populace tráví zimu daleko od svých mateřských kolonií. Bohužel i přes to, že přes léto jsou tyto netopýři ve střední Evropě velmi početným druhem, přes zimu je známo jen pár jejich kolonií, i když některé z nich jsou masové (Nagy & Szántó, 2003). Co se konkrétně týče *P. pygmaeus*, jeho zimní kolonie nejsou téměř vůbec pozorované. To může být způsobeno tím, že dává přednost spíše štěrbinám ve skalách a stromech než podzemním jeskyním, jak je tomu u *P. pipistrellus* (Bartonička & Řehák, 2004) a nebo právě možnými migracemi daleko od mateřských kolonií (Bryja et al., 2009). I přesto, že oba druhy by měly být na migrace na dlouhou vzdálenost dobře vybaveny (poměr stran křídel – Norberg & Rayner, (1987)), nedá se s jistotou říct, jestli druhy dlouhé migrace podstupují či nikoliv.

Další možností, jak vysvětlit nízkou genetickou strukturu v populaci je, že alespoň jedno z pohlaví se šíří daleko od místa původního narození. U mnoha druhů temperátních netopýrů, se u samic vyskytuje vysoká míra filopatrie (včetně pipistrellů), zatímco mladí samci kolonie opouštějí a páří se se samicemi z kolonií

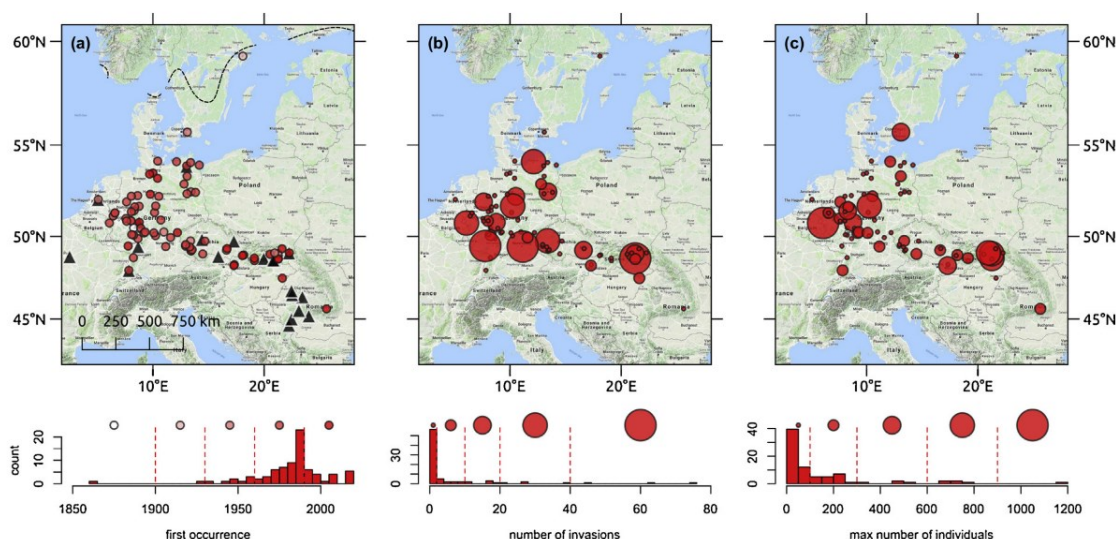
vzdálených (například *Myotis myotis* – Castella et al., 2001; *Nyctalus noctula* – Petit & Mayer, 1999), což by právě vysvětlovalo tento jev.

Nicméně ani jedna z hypotéz nebyla potvrzena a migrace na dlouhé vzdálenosti nebo pouze disperzní chování samců musí být podrobena ještě dalšímu zkoumání.

### 1.3.2 Hibernace a masová zimoviště

Homoiotermní živočichové v temperátních oblastech mají několik možností, jak se vyrovnat s nepřízní podmínek během zimních měsíců. Mohou se na zimní měsíce přesunout do míst s příznivějším klimatem, během léta a podzimu si mohou vytvořit zásoby potravy a poté z těchto zásob přes zimu čerpat, a nebo mohou snížit výdej energie změnou aktivity, což je spojeno s fyziologickými modifikacemi zahrnujícími mimo jiné i adaptivní hypotermii. (Speakman & Racey, 2006)

I přes to, že by se pro netopýry mohlo zdát jako nejjednodušší strategie přesunout se za příznivějšími podmínkami, mnoho temperátních druhů, včetně netopýrů rodu *Pipistrellus*, zůstává zde a zimní měsíce překonávají v hibernaci. A ačkoliv jsou *P. pipistrellus* a *P. pygmaeus* kryptické druhy, které se zdají být na první pohled totožné, ukazuje se, že jejich chování v rámci migrací a strategie zimování se úplně nepřekrývají.



Obr 6: Distribuce známých zimovišť a invazních událostí v rámci druhu *P. pipistrellus*; (a) zaznamenání první invaze – kolečka a lokality velkých evropských zimovišť – černé trojúhelníky (čárkovaná čára značí severní hranici výskytu *P. pipistrellus*), (b) celkový počet invazí v daných místech, (c) maximální počet jedinců nalezených během jediné invazní události; grafické zobrazení distribuce dat je zobrazeno na dolním histogramu pod každou mapou (Nusová et al., 2019)

Oba druhy patří mezi jedny z nejběžnějších netopýrů v Evropě, nicméně *P. pygmaeus* pravděpodobně žije skrytějším způsobem života než *P. pipistrellus* a o jeho způsobu zimování se toho tolik neví. Naopak u *P. pipistrellus* je život v letních i zimních koloniích prozkoumán velice podrobně. Přes léto tvoří velké mateřské kolonie (i několik stovek jedinců), poté po období swarmingu a přesunu na zimoviště (většinou se jedná o velké podzemní jeskyně) se jejich kolonie ještě zvětšují a mohou čítat i desetitisíce jedinců – například nález z jeskyně Sura Mare z jižních Karpat či nález z jeskyně Huda lui Paparã z oblasti západních Karpat (Nagy & Szántó, 2003).

Touto problematikou se zabývala i studie od autorů Kaňuch et al., (2010). Během podzimu a zimy jednoho roku byla sledována známá zimoviště pipistrellních netopýrů. Celkem bylo navzorkováno 463 jedinců, z čehož byli všichni, kromě čtyř jedinců, určeni jako příslušníci druhu *P. pipistrellus*. Pouze čtyři jedinci byli určeni jako *P. pygmaeus*, kteří se pravděpodobně k zimující kolonii připojili omylem. Stejně tak nebyli nalezeni žádní zástupci druhu *P. pygmaeus* ani při zkoumání budov, do kterých se dostali zástupci *P. pipistrellus* při jejich typických podzimních invazích. *P. pygmaeus* tedy pravděpodobně hibernuje v mnohem menších koloniích a na skrytějších místech jako jsou například štěrby stromů či trhliny ve skalách (Kaňuch et al., 2010). S ohledem na strategie obou druhů se ukazuje, že silný genový tok se vyskytuje pouze mezi jedinci *P. pipistrellus* právě díky jejich masovým zimovištím (Nusová et al., 2017).

#### 1.4 Možná hybridizace mezi oběma druhy

Objevení dvou kryptických druhů vyvolává otázku, zda mezi nimi nemůže docházet k mezidruhové hybridizaci. Touto problematikou se zabývali například autoři Park, Altringham, & Jones (1996) ve své behaviorální studii v místech páření netopýrů. To probíhalo v takzvaných „bat boxes“ – netopýřích budkách – navržených právě pro tyto účely a i přesto, že v místech, kde byly budky umístěny, se vyskytovaly oba druhy netopýrů, v budkách byl podle bioakustiky zaznamenán vždy pouze jeden druh. Vzhledem k těmto poznatkům, včetně již dříve zmiňovaných odlišností, vychází najevo, že i přesto že jsou oba druhy sympatrické a mají podobné

životní strategie, měly by mezi nimi fungovat úplné reprodukční bariéry a k hybridizaci by docházet nemělo (Racey et al., 2007).

Sztencel-Jabłonka & Bogdanowicz, (2012) nicméně argumentuje, že předchozí dvě velké studie zabývající se populační genetikou těchto dvou druhů, studie Racey et al., (2007) a Bryja et al., (2009), dostatečně nepokrývaly celý areál a hybridizace tam není prokázána právě z tohoto důvodu. Podle Sztencel-Jabłonka & Bogdanowicz, (2012) jsou ve střední Evropě (zejména v její severní části – Polsku) krutější zimy, což podporuje migraci a potenciální silný genový tok, pokud by k páření docházelo až po domigrování na místa zimovišť. Ačkoliv byl podle této studie středoevropský *P. pipistrellus* označen jako více migratorní druh oproti *P. pipistrellus* žijícímu na Bristkých ostrovech, pořád je oproti *P. pygmaeus* mnohem více sedentární. U *P. pipistrellus* funguje spíše disperzní chování a pouze takzvaná regionální migrace na krátké vzdálenosti (do 50 km) a sezónní migrace na delší vzdálenosti je předpokládána spíše u *P. pygmaeus*. Nicméně se jedná pouze o předpoklad, žádná větší zimoviště zatím nebyla nalezena. (Sztencel-Jabłonka & Bogdanowicz, 2012)

Podle výše zmíněné studie v Evropě hybridizace mezi těmito druhy nicméně objevena byla. Jednalo se o jedince z okrajových částí areálu výskytu pipistrellů, konkrétně o jedince ze čtyř nejvýchodnějších kolonií *P. pygmaeus*. Další domnělí hybridy pocházeli ze dvou kolonií *P. pipistrellus* v oblasti jihozápadního Polska. V obou případech byla přítomnost hybridů způsobena pravděpodobně nerovnoměrností výskytu jedinců obou druhů a nekompletností vnitřních reprodukčních izolačních mechanismů. (Sztencel-Jabłonka & Bogdanowicz, 2012)

## 2. CÍLE PRÁCE

- 1) Získat vzorky ze zimovišť dvou kryptických druhů *Pipistrellus pipistrellus* a *Pipistrellus pygmaeus* z oblasti střední Evropy, která se nachází na severovýchodní hranici areálu tohoto jevu.
- 2) Ze získaných vzorků vyizolovat DNA a amplifikovat rychle se vyvíjející genetické markery (kontrolní oblast mitochondriální DNA, jaderné mikrosatelity) a popsat jejich variabilitu.
- 3) Popsat druhové složení jednotlivých kolonií. Analýzou potenciálních cytonukleárních konfliktů a/nebo hybridních jaderných genotypů ověřit potenciální výskyt hybridizace a introgrese. Výsledky interpretovat z hlediska reprodukční biologie obou zkoumaných druhů.
- 4) Srovnat genetickou variabilitu na zimovištích s publikovanými daty z ostatních oblastí Evropy a doplnit znalosti o populační struktuře a prostorovém chování obou zkoumaných druhů během temperátního cyklu. Na modelové lokalitě v Třebenicích studovat roční změny v populační struktuře.

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Materiál

Pro analýzy byl získán genetický materiál od celkem 233 jedinců druhu *Pipistrellus pipistrellus* nebo *Pipistrellus pygmaeus* (viz Příloha 3). Vzorky byly získány ze čtyř oblastí masových zimovišť, z obce Svatý Jan pod Skalou v chráněné krajinné oblasti Český kras, z obtokového kanálu vodního díla Slapy u obce Třebenice ve Středočeské pahorkatině, z východní části Slovenského krasu z jeskyně Erňa a z oblasti Západních Karpat v Rumunsku z jeskyně Huda lui Papară.

Vzorky tkáně netopýrů byly získány ve většině případů nekropsií z oblasti chiropatagia u exemplářů uhynulých během hibernace v tuhých zimách, malá část srovnávacích vzorků z lokality Slapy pomocí 2mm biopsie z chiropatagie před vlastní hibernací během swarmingu. Tkáň byla uložena do 2 ml mikrozkušavek do 96 % ethanolu a skladována v mrazících boxech při -20°C.

Do finálního datasetu bylo zařazeno ještě 272 již publikovaných sekvencí z prací Hulva et al. (2010) – převážně sekvence jedinců z oblasti Mediteránu, střední a východní Evropy a Boston et al. (2014) – většina sekvencí od jedinců z oblasti západní a severní Evropy (Portugalsko, Francie, Velká Británie, Irsko), získaných z databáze GenBank.

#### 3.2 Metodika

##### 3.2.1 Izolace DNA

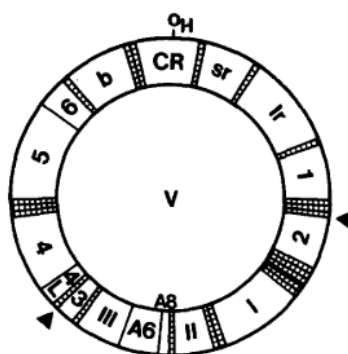
Nejprve byla provedena izolace DNA pomocí kitu Qiagen DNeasy Blood & Tissue kit. Z jednotlivých vzorků byla sterilními nástroji odebrána zhruba polovina tkáně a pomocí skalpelu byla na Petriho misce rozdělena na malé části. Po odpaření ethanolu byla tkáň přenesena do 1,5 ml zkumavky, kde byla nejprve přes noc inkubována při 56 °C ve 180 µl ATL pufru společně s 15 µl proteinázy K. V případě, že do dalšího dne nedošlo k úplné lyzi tkáně, bylo přidáno ještě dalších 5 µl proteinázy K.

Zlyzovaná tkáň byla poté důkladně zvortexována (přibližně 15 s) a bylo k ní přidáno 200 µl AL pufru a 200 µl 96 % ethanolu. Mezi těmito kroky vždy došlo ke zvortexování vzorku a jeho zcentrifugování při 14 000 rpm. Poté byl obsah zkumavek přepipetován do kolonek a zcentrifugován při 8 000 rpm. Do kolonek

Poté byly kolonky vloženy do označených 1,5 ml zkumavek a do středu membrány bylo přidáno 100 µl elučního AE pufru. Po zhruba minutové inkubaci při pokojové teplotě byly vzorky zcentrifugovány a vyizolovaná DNA byla uložena v mrazícím boxu při teplotě -20 °C.

Pro analýzu mitochondriální DNA byla vybrána nekódující kontrolní oblast, obsahující replikační počátek (D-loop) a vyznačující se vysokou mutační rychlostí. Tento úsek se nachází mezi geny pro cytochrom *b* a malou podjednotku ribozomální RNA a skládá se ze dvou hypervariabilních domén (HVI a HVII), které jsou odděleny konzervovanou centrální doménou (Hulva et al., 2010).

K amplifikování části centrální a části pravé hypervariabilní domény byl použit forwardový primer L16517 (CATCTGGTCTTACTTCAGG; (Fumagalli et al., 1996)) a reverzní primer H607 (AGGACCCATCTAAGCATTTTCAGTG; (Worthington, et al., 1994)).



23

PCR reakce byla provedena ve 25  $\mu$ l objemu v termocykleru T100™ Thermal Cycler Bio Rad. Složení PCR reakční směsi a termální protokol jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 1, Tab. 2).

reagencie	koncentrace	objem ( $\mu$ l)
ddH <sub>2</sub> O		9,5
PPP Master Mix	2x	12,5
primer F	10 $\mu$ M	1
primer R	10 $\mu$ M	1
DNA	10 ng/ $\mu$ l	1
celkem		25

Tab. 1: Složení PCR reakční směsi; složení PPP Master Mixu (2x koncentrovaný): 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25 °C); 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,02 % Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 400  $\mu$ M dATP; 400  $\mu$ M dCTP; 400  $\mu$ M dGTP; 400  $\mu$ M dTTP; 100 U/ml Taq DNA polymeráza, barvivo, stabilizátory, aditiva (oficiální stránky výrobce: <http://www.top-bio.cz/pcr-master-mixy-12.html?ppp-master-mix>)

krok	teplota	čas
1	94 °C	3 min
2	94 °C	45 s
3	55 °C	45 s
4	72 °C	1 min
5	72 °C	7 min

Tab. 2: Termální protokol; kroky 2 – 4 byly 40x opakovány

Po skončení PCR byl celý objem produktu přenesen na 1 % agarózový gel k ověření úspěšnosti PCR reakce a v případě kladného výsledku bylo provedeno extrahování DNA z gelu. Pro porovnání délky amplifikovaného úseku byly do jedné z jamek nanесeny 2  $\mu$ l délkového standardu a pro ověření, že během manipulace s chemikáliemi nedošlo k jejich kontaminaci, byla vždy prováděna negativní



kontrola (PCR směs bez přidané DNA). DNA byla separována během elektroforézy za podmínek 100 V, 400 mA, 35 min a poté sterilními nástroji vyříznuta z gelu.

### 3.2.3 Pročištění

Pročištění DNA bylo provedeno pomocí QIAquick Gel Extraction kitu od Qiagenu. Vyříznuté gelové plátky obsahující DNA byly nejprve zváženy a podle jejich hmotnosti bylo vypočteno, jaký objem QG pufru bude přidán – hmotnost 100 mg plátku odpovídala 100 µl QG pufru a vždy se přidával objem trojnásobné váhy plátků.

Poté byly vzorky 10 minut inkubovány při 50 °C a každé 2 – 3 minuty vortexovány. Po úplném rozpuštění gelového plátku byl přidán podle váhy plátků 1x objem isopropanolu (opět platilo 100 mg = 100 µl) zvyšující výtěžek DNA fragmentů. Vzorky byly zvortexovány, přeneseny do kolonek a při 13 000 rpm zcentrifugovány. Ke vzorkům bylo postupně přidáno 500 µl QG a 750 µl PE pufru a mezi jednotlivými kroky byla vždy provedena centrifugace při 13 000 rpm a obsah sběrné zkumavky byl vyprázdněn. Na závěr byly vzorky ještě jednou zcentrifugovány bez přidání další látky. Kolonky byly poté přemístěny do popsaných 1,5 ml zkumavek a ponechány přibližně 5 minut odvětrat zbytkový ethanol. Poté bylo do středu membrány nanášeno 30 µl elučního pufru, vzorky byly při pokojové teplotě 2 minuty inkubovány a poté zcentrifugovány.

Po přečištění byla na spektrofotometru NanoDrop™ ND-1000 změřena výsledná koncentrace získané DNA a DNA byla připravena k poslání na sekvenační analýzu. Zbýlá DNA byla uchována při -20 °C v mrazících boxech.

Namíchání sekvenační reakce bylo prováděno podle doporučení sekvenační laboratoře. Jednotlivé vzorky byly připravovány do 0,2 ml stripů v celkovém objemu 8 µl. Požadovaná koncentrace DNA pro sekvenační analýzu činila 5 ng/100bp. Podle naměřených hodnot koncentrace DNA byl vypočítán objem DNA a napipetován do stripů, ke každému vzorku bylo přidáno 0,5 µl forwardového primeru L16517 a objem byl doplněn do 8 µl ddH<sub>2</sub>O.

Sekvenační analýza probíhala na přístroji 3130 Genetic Analyzer od firmy Applied Biosystems® v Laboratoři sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě UK.

### 3.2.4 Analýza mikrosatelitových markerů

Vyizolovaná DNA byla dále použita k analýze mikrosatelitových lokusů. Primery pro analýzu těchto lokusů byly převzaty již navržené a to buď obecně pro netopýry z čeledi *Vespertilionidae* nebo byly konkrétně zaměřeny na rod *Pipistrellus* (Tab. 3). Zkoumáno bylo celkem 9 lokusů rozdělených do tří multiplexů.

lokus	oblast výskytu	autoři
EF1	144 - 183	Vonhof et al., 2002
EF4	216 - 258	Vonhof et al., 2002
Paur05	234 - 261	Burland, Barratt, & Racey, 1998
NnP217	167 - 221	Mayer, Schlötterer, & Tautz, 2000
NnP219	123 - 186	Mayer, Schlötterer, & Tautz, 2000
Ppip01	153 - 186	Racey et al., 2007
Ppip06	109 - 196	Racey et al., 2007
Ppip04	197 - 231	Racey et al., 2007
Ppip02	118 - 140	Racey et al., 2007

Tab 3: Lokusy použité v této práci

PCR reakce byla provedena v termocykleru T100™ Thermal Cycler Bio Rad nejprve v objemu 10 µl, postupně byl objem snížen na 5 µl. Do reakcí byly použity dva typy multiplexového mixu, starší Qiagen Multiplex PCR Kit a novější typ Type-it Microsatellite PCR Kit taktéž od firmy Qiagen. Ve složení a objemu jednotlivých reagensů reakční směsi nebyl rozdíl, nicméně se lišilo doporučení pro termální protokol u jednotlivých kitů (Tab. 4, Tab. 5).

reagencie	koncentrace	objem (µl)	objem (µl)
ddH <sub>2</sub> O		3	1,5
Multiplex/Type-it Mix	1x	5	2,5
Primer mix	0,2 µM	1	0,5
DNA	10 ng/µl	1	0,5
celkem		10	5

Tab. 4: Složení PCR reakční směsi

Multiplex PCR Kit			Type-it Microsatellite PCR Kit		
krok	teplota	čas	krok	teplota	čas
1	95 °C	15 min	1	95 °C	5 min
2	94 °C	30 s	2	95 °C	15 min
3	60 °C	90 s	3	94 °C	30 s
4	72 °C	60 s	4	60 °C	90 s
5	72 °C	10 min	5	60 °C	30 min

Tab. 5: Termální protokoly pro jednotlivé kity; kroky 2 – 4 byly 35x opakovány

Po skončení PCR reakce byl produkt přichystán na fragmentační analýzu. Namíchání reakce bylo provedeno podle doporučení sekvenační laboratoře a jednotlivé vzorky byly připravovány do 0,2 ml stripů v celkovém objemu 10 µl. Do každého stripu bylo napipetováno 0,5 µl PCR produktu, 0,5 µl velikostního standardu (Applied Biosystems™ GeneScan™ 500 LIZ™ Dye Size Standard) a 9 µl formamidu. Poté byly vzorky zdenaturovány při 94 °C na 5 min.

Fragmentační analýza probíhala na přístroji 3130xl Genetic Analyzer od firmy Applied Biosystems® v Laboratoři sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě UK.

### 3.3 Analýza dat

#### 3.3.1 Mitochondriální sekvence – zpracování chromatogramů

Po přijetí výsledků ze sekvenační laboratoře byly soubory nejprve roztrženy a přejmenovány a poté byla zkontrolována kvalita sekvencí. Zobrazení raw sekvencí, editace a BLAST byly provedeny pomocí programu Geneious 11.0.5 (Kearse et al., 2012). Kvalita byla posouzena následovně – při sekvenační reakci byla požadovaná délka amplifikovaného fragmentu 500 bp, tedy sekvence kratší než 400 bp byly vyřazeny. Dále byly vyřazeny sekvence nízké kvality (kvalitu každé jednotlivé báze zobrazoval program, ve kterém byly sekvence editovány) a sekvence, u kterých špatně proběhla sekvenační reakce (způsobeno pravděpodobně nízkým obsahem DNA v reakci) a nebylo u nich možné s jistotou určit pořadí bází. Každá sekvence pak byla odeslána do programu BLAST a na základě alignmentu k nejpodobnějším již publikovaným sekvencím bylo určeno, o který druh netopýra se jedná.

Po získání všech použitelných sekvencí a jejich rozdělení mezi dva druhy (*P. pipistrellus* a *P. pygmaeus*) byla nejprve částečně upravena délka sekvencí a v programu Geneious byl pro každý druh proveden alignment – základní Geneious global alignment with free end gaps – typ alignmentu, kdy nejsou přidávány penalizace do skóre kvality sekvencí za volné nezalignované konce při hledání optimálního alignmentu. Poté byly oba alignmenty podrobně prohlédnuty a každá mutace překontrolována, zda se opravdu jedná o mutaci, či jen chybu v sekvenaci. Poté bylo k sekvencím přialignováno několik již publikovaných sekvencí z práce Hulva et al., (2010) a sekvence obou alignmentů byly zkráceny na příslušnou délku podle publikovaných dat pro každý druh.

Po prvotním alignmentu byl proveden druhý alignment všech sekvencí – jak nově získaných, tak již publikovaných z prací Hulva et al., (2010), Boston et al., (2014) a Fornůsková et al., (2014). Alignment byl proveden v online verzi programu MAFFT (Kato et al., 2017) podle algoritmu G-INS-1. Po překontrolování alignmentu bylo u obou druhů provedeno ještě jedno zkrácení sekvencí a to podle kratších publikovaných sekvencí z práce Boston et al., (2014) a sekvence s chybějícími údaji byly vyřazeny. Toto zkrácení mohlo být provedeno z toho důvodu, že u obou druhů jsou amplifikované úseky variabilní zejména ve středu a začátku a konce úseků jsou značně konzervované. Celkem tak bylo pro alignment

využito 242 sekvencí pro druh *P. pipistrellus* s finální délkou 286 bp a 149 sekvencí pro druh *P. pygmaeus* s finální délkou 282 bp.

### 3.3.2 Analýza variability mitochondriálního markeru

Pro základní náhled na variabilitu mitochondriálního markeru a zjištění příslušnosti haplotypů k haploskupinám byl zkonstruován strom metodou Neighbor-joining s použitím kompletní delece oblastí alignmentu s mezerami v programu MEGA (Tamura et al., 2007). Jako outgroup byla použita sekvence *Pipistrellus kuhlii*, který představuje zástupce sesterského kladu k radiaci *P. pipistrellus* (Koubínová et al., 2013).

Poté bylo vytvořeno pět alignmentů, které obsahovaly pouze námi získané jedince rozdělené podle lokality nálezů – tři alignmenty tvořili pouze jedinci druhu *P. pipistrellus* a dva alignmenty byly tvořeny zástupci druhu *P. pygmaeus*. Alignmenty byly ve formátu fasta postupně nahrány do programu DnaSP v5 (Rozas et al., 2003), ve kterém byly pro každou populaci spočítány základní popisné charakteristiky genetické variability. Zjišťován byl počet variabilních míst ( $S$ ), počet haplotypů ( $N_h$ ), diverzita haplotypů ( $h$ ), diverzita nukleotidů ( $\pi$ ), expanzní koeficient (počítá se jako poměr počtu variabilních míst ku průměru počtu rozdílů mezi páry nukleotidů ( $k$ )). V DnaSP v5 byly spočítány i testy neutrality (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), které zahrnují metodu nezávislou na párovém porovnávání (statistiky Fu & Li's  $F^*$ , Fu & Li's  $D^*$ , Fu's  $F_s$  a Tajima's  $D$ ).

Alignment všech našich sekvencí a publikovaných sekvencí zvlášť pro oba druhy byl ve fasta formátu také nahrán do programu DnaSP v5 a pro oba druhy byl zjištěn počet haplotypů ( $N_h$ ) a jejich diverzita ( $h$ ). U jedinců ze zimních kolonií, jejichž haplotyp se shodoval s již dříve publikovaným haplotypem, se tak dalo zjistit, z jaké oblasti se na zimoviště pravděpodobně dostali.

Dále byly všechny publikované haplotypy rozděleny do skupin podle jednotlivých zemí a vytvořeny jejich alignmenty. Pro druh *P. pipistrellus* tak byly získány haplotypy k porovnání pro šestnáct zemí, u druhu *P. pygmaeus* se podařilo získat haplotypy ze čtrnácti zemí. Alignment každé země pak byl porovnán s alignmentem pro každou kolonii.

Pomocí programu DnaSP v5 byla spočítána párová  $F_{ST}$  statistika, pro mitochondriální DNA označovaná jako  $\Phi_{ST}$  statistika, vyjadřující takzvaný fixační

index, který popisuje míru diferenciace populace v důsledku její genetické struktury (Nei, 1986). Zároveň byla spočtena ještě statistika nejbližšího souseda (Snn), která je měřítkem toho, jak často jsou „nejbližší sousedé“ sekvenční sekvence ze stejné geografické lokality (Hudson, 2000).

### **3.3.3 Jaderné mikrosatelity – zpracování chromatogramů**

Po přijetí výsledků ze sekvenační laboratoře, byl základní postup zpracování dat identický jako u mitochondriálních sekvencí – jednotlivé soubory byly nejprve přejmenovány a roztrženy do jednotlivých složek. Po roztržení bylo nutné provést allele calling. Jako základ správného allele callingu je nutné si nejprve správně nastavit velikostní standard. Námi využívaný velikostní standard byl od Applied Biosystems™ GeneScan™ 500 LIZ™ Dye Size Standard, který má peaky ve vzdálenostech 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 a 500 nukleotidů. Poté byl proveden samotný allele calling, kdy se vzdálenost jednotlivých peaků odečítá od správně nastaveného velikostního standardu. Zobrazování dat a allele calling byl proveden v programu Geneious 11.0.5.

V další fázi byl proveden binning – tedy nahrazení měření délek alel při kapilární elektroforéze zahrnujícího i odchylky měření (desetinná čísla) skutečnými délkami alel (celá čísla). K této proceduře byl využit volně stažitelný excelovský sešit FlexiBin (Amos et al., 2007). Protože FlexiBin vytváří alely jako konstrukty v hodnotách přirozených čísel, byly tyto hodnoty přepočítány na reálné délky alel.

<i>lokus</i>	<i>oblast výskytu</i>	<i>motiv</i>
<b>EF1</b>	144 - 183	(GT) <sub>22</sub> CT(GT) <sub>17</sub>
<b>EF4</b>	216 - 258	(CT) <sub>4</sub> (GT) <sub>17</sub>
<b>Paur05</b>	234 - 261	(GT) <sub>10</sub>
<b>NnP217</b>	167 - 221	(CTAT) <sub>2</sub> CAT(CTAT) <sub>11</sub> (CATCTAT) <sub>4</sub> (CTAT) <sub>2</sub> (CATCTAT) <sub>2</sub> TAT(CTAT) <sub>3</sub> (CAT) <sub>2</sub> CTAT
<b>NnP219</b>	123 - 186	(CTAT) <sub>7</sub> (CCAT) <sub>6</sub>
<b>Ppip01</b>	153 - 186	dinukleotid
<b>Ppip06</b>	109 - 196	dinukleotid
<b>Ppip04</b>	197 - 231	dinukleotid
<b>Ppip02</b>	118 - 140	dinukleotid

Tab. 6: Motivy mikrosatelitů v jednotlivých lokusech

### 3.3.4 Analýza variability mikrosatelitových markerů

Před dalšími analýzami byl proveden výpočet odhadu frekvence nulových alel. Ten byl spočítán pomocí volně stažitelného softwaru FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007). Aby mohla být analýza provedena, bylo nejprve nutné excelovský soubor se zabinovanými a přepočítanými hodnotami převést do textového souboru ve formátu GENEPOP (převáděno pomocí volně dostupného softwaru GeneClass2 (Piry et al., 2004)). Po konverzi dat byla spočítána analýza s 1000 opakováními a 95 % intervalem spolehlivosti pro oba druhy zvlášť. Výsledky byly rozčleněny do tří skupin dle odhadu pravděpodobnosti výskytu nulových alel: zanedbatelná ( $x < 0,05$ ), střední ( $0,05 \leq x < 0,20$ ) a vysoká ( $x \geq 0,20$ ) (Chapuis & Estoup, 2007).

S upravenými daty po binování byla spočítána Bayesiánská klastrovací procedura za využití volně stažitelného programu Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Tato procedura má za úkol odhadnout počet odlišných genetických populací a přiřadit k nim jednotlivce z celého datasetu.

Vstupním formátem dat byl textový soubor se všemi jedinci našeho datasetu – celkem 219 jedinců. První run byl proveden jako základní náhled na data s dvěma nadefinovanými populacemi, hodnotou Length of burning period nastavenou na 100 000 a počtem MCMC opakování 1 000 000. Celkem bylo provedeno deset nezávislých simulací pro každé K (K bylo nastaveno v rozmezí 1 až 5 populací).

Zvolen byl admixture model a korelované frekvence alel, byl použit parametr Locprior.

Po získání výsledků byl dataset upraven podle výsledku a rozdělen na dva druhy – *P. pipistrellus* (160 jedinců) a *P. pygmaeus* (59 jedinců). Pro oba druhy pak byla spočítána analýza zvlášť za využití admixture modelu a korelované frekvence alel a nastavenými hodnotami Length of burning period 100 000 a počtem MCMC opakování 1 000 000. Parametr Locprior využit nebyl. Počet simulací byl nastaven na 10 pro  $K = 1 - 5$ . U obou druhů byly ve vstupním souboru ještě nadefinovány populace dle lokality nálezů vzorků (2 populace *P. pygmaeus*, 3 populace *P. pipistrellus*). Zobrazení výsledků bylo provedeno pomocí online softwaru Structure Selector (Li & Liu, 2017).

Popisné statistiky založené na mikrosatelitových datech byly spočítány v programu FSTAT (Goudet, 1995) ver. 2.9.3.2. Data byla rozdělena do pěti populací dle lokality nálezů a pro každou skupinu dat byl vytvořen textový soubor, který byl pomocí programu GeneClass2 (Piry et al., 2004) překonvertován do formátu potřebného pro tento program.

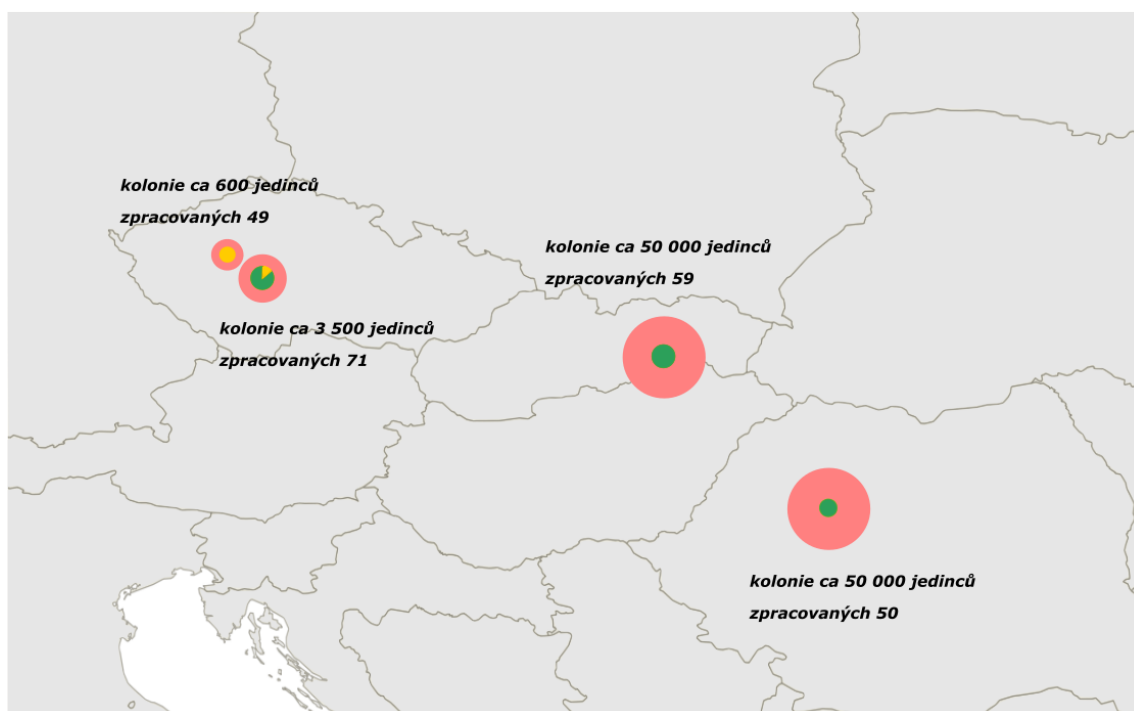
Pro každou populaci zvlášť byl v FSTATu spočítán celkový počet alel pro všechny lokusy pro danou populaci (AS), průměrný počet alel na lokus ( $A$ ), odhad genové diverzity (GD) a bohatost alel (AR). Z populací z lokalit Erňa a Huda lui Paparã musel být pro tyto statistiky vyloučen lokus EF4. U jedinců získaných ze zimoviště v jeskyni Erňa nebyla pro tento lokus odečtena žádná alela, ze zimoviště v jeskyni Huda lui Paparã se odečet podařil pouze u jednoho jedince a program tedy nebyl schopen spočítat příslušné statistiky.



## 4. VÝSLEDKY

Ne ze všech zpracovaných vzorků se podařilo vyizolovat dostatečné množství či dostatečně kvalitní DNA, což bylo příčinou selhání PCR. Použitelných vzorků, u kterých se podařilo získat informaci alespoň z jednoho typu markeru bylo 229, což činí téměř stoprocentní úspěšnost. Vzorků, u kterých se povedlo získat informaci pro oba typy markeru, pak bylo 115, tedy přes polovinu všech vzorků.

Z celkového počtu 229 jedinců bylo 170 identifikováno jako druh *Pipistrellus pipistrellus* a 59 jedinců jako druh *Pipistrellus pygmaeus*.



Obr. 8: Mapa jednotlivých lokalit se zobrazením velikosti zimujících kolonií (světle červená) a složení získaného populačního vzorku (žlutá *Pipistrellus pygmaeus*, zelená *Pipistrellus pipistrellus*), směrem od západu k východu lokality: Svatý Jan pod Skalou (Česká republika), Třebenice (Česká republika), Erňa (Slovensko), Huda lui Papară (Rumunsko)

### 4.1 Analýza mitochondriální DNA

Z 229 vzorků se povedlo získat mitochondriální DNA u 126 jedinců, což činí přibližně 55% úspěšnost. Jako druh *Pipistrellus pipistrellus* bylo identifikováno 83 jedinců, 43 jedinců bylo na základě mitochondriální sekvence určeno jako druh *Pipistrellus pygmaeus*.

#### 4.1.1 Určení haplotypů a původu jednotlivých kolonií

Pro určení haplotypů bylo využito 159 publikovaných sekvencí druhu *P. pipistrellus* a 106 publikovaných sekvencí pro druh *P. pygmaeus*. Po přiřazení vzorků k jednotlivým haplotypům bylo zjištěno, kde byl daný haplotyp popsán a odkud by potenciálně mohl daný jedinec pocházet. U každé kolonie bylo zároveň popsáno i několik nových haplotypů. Výsledný Neighbor-joining strom je uveden v Příloze 4.

Všechny vzorky *P. pygmaeus* spadaly do jednoho velmi homogenního kontinentálního klastru. Většina vzorků *P. pipistrellus* spadala do středoevropské haploskupiny (Central European haplogroup). Dva vzorky ze zimní kolonie v Třebenicích spadaly do keltské (Celtic) a jeden do západoevropské (West European) haploskupiny (Boston et al., 2014).

<i>Sv. Jan pod Skalou</i>	<i>země</i>	<i>Sv. Jan pod Skalou</i>	<i>země</i>	<i>Třebenice</i>	<i>země</i>
<b>PIP12</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira	<b>PIP34</b>	Ru, Uk, ČR	<b>ST6</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira
<b>PIP13</b>	Ir, Ru, Sv	<b>PIP42</b>	ČR, Po	<b>ST7</b>	<i>nový</i>
<b>PIP14</b>	Ru	<b>PIP45</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira	<b>ST15</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira
<b>PIP16</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira	<b>PIP46</b>	Ir, Ru, ČR, Sv, Po, An, Ře, Fr	<b>ST16</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira
<b>PIP19</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira	<b>PIP47</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira	<b>ST21</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira
<b>PIP20</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira	<b>PIP48</b>	Ir, Ru, Sv	<b>ST41</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira
<b>PIP21</b>	<i>nový</i>	<b>PIP49</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira	<b>ST61</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira
<b>PIP22</b>	<i>nový</i>	<b>PIP50</b>	Ir, Ru, ČR, Sv, Po, An, Ře, Fr	<b>ST72</b>	Ru
<b>PIP23</b>	Ir	<b>PIP51</b>	<i>nový</i>		
<b>PIP24</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira	<b>PIP52</b>	<i>nový</i>		
<b>PIP25</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira	<b>PIP53</b>	Uk		
<b>PIP26</b>	<i>nový</i>	<b>PIP54</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira		
<b>PIP27</b>	Ir, Ru, Sv	<b>PIP56</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira		
<b>PIP28</b>	Ir, Ru, ČR, Sv, Po, An, Ře, Fr	<b>PIP57</b>	<i>nový</i>		
<b>PIP29</b>	Ir, Ru, ČR, Sv, Po, An, Ře, Fr	<b>PIP58</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira		
<b>PIP30</b>	<i>nový</i>	<b>PIP59</b>	<i>nový</i>		
<b>PIP33</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira	<b>PIP60</b>	Ir, Ru, Uk, ČR, Sv, Po, An, Ře, Šv, Ira		

Tab. 7: Tabulka s určením výskytu haplotypů u jedinců druhu *P. pygmaeus*; An – Anglie, ČR – Česká republika, Fr – Francie, Ira – Írán, Ir – Irsko, Po – Polsko, Ru – Rusko, Ře – Řecko, Sv – Slovensko, Šv – Švýcarsko, Uk – Ukrajina

Třeбенice	země	Erňa	země	Huda lui Paparã	země
ST1	nový	E18	nový	H6	nový
ST2	nový	E20	nový	H11	nový
ST8	Pol	E22	ČR	H12	ČR, Svk, Něm
ST9	nový	E36	ČR	H14	nový
ST10	nový	E37	nový	H16	nový
ST11	ČR, Něm	E38	ČR	H17	Svk
ST13	ČR, Svk, Něm	E54	nový	H32	nový
ST17	nový	E55	ČR	H34	Něm
ST19	Svk	E56	nový	H35	nový
ST22	ČR	E57	nový	H36	nový
ST46	nový	E58	ČR	H38	nový
ST50	nový	E61	nový	H39	ČR
ST55	nový	E63	ČR	H40	nový
ST56	nový	E65	ČR	H41	nový
ST57	nový	E66	Svk	H42	nový
ST58	Pol	E67	ČR	H44	nový
ST59	ČR	E68	nový	H46	ČR
ST60	nový	E72	ČR	H47	Svk
ST63	Pol	E74	ČR	H51	Něm
ST64	ČR	E75	ČR	H52	ČR
ST67	ČR	E77	Svk	H54	nový
ST68	nový	E78	Svk	H55	ČR
ST69	ČR	E79	nový	H56	Svk
ST73	ČR	E85	ČR	H60	Svk
ST75	Fra, Ang	E86	ČR		
ST76	ČR	E88	Něm		
ST77	Ire, Ang, Fra	E89	nový		
ST80	nový				
ST81	nový				
ST82	ČR				
ST83	ČR				
ST84	ČR				

Tab. 8: Tabulka s určením výskytu haplotypů u jedinců druhu *P. pipistrellus*; Ang – Anglie, ČR – Česká republika, Fra – Francie, Ire – Irsko, Něm – Německo, Pol – Polsko, Svk – Slovensko

$\Phi_{ST}$  a  $S_{nn}$  statistiky byly spočteny pro jednotlivé kolonie i pro oba druhy netopýrů z lokality Třeбенice po rozdělení zvlášť pro zimní kolonii a swarmující populaci u zimoviště (Tab. 9, 10, 11).

Sv. Jan pod Skalou			Třebenice		
<i>P. pygmaeus</i>	$\Phi_{ST}$	Snn	<i>P. pygmaeus</i>	$\Phi_{ST}$	Snn
Ang+SevIR	-0,03	0,80	Ang+SevIR	0,04	0,62
Česká republika	0,01	0,62	Česká republika	0,15	0,69
Francie	0,35	0,87	Francie	0,55	1,00
Irsko	0,002	0,57	Irsko	0,08	0,78
Ita+Kor	0,30	0,88	Ita+Kor	0,44	0,95
Kypr	0,86	1,00	Kypr	0,88	1,00
Polsko	0,00	0,74	Polsko	0,04	0,59
Řecko	0,01	0,64	Řecko	0,13	0,63
Rusko	0,01	0,56	Rusko	0,12	0,70
Španělsko	-0,06	0,90	Španělsko	0,00	0,80
Slovensko	-0,05	0,74	Slovensko	0,01	0,57
Švýcarsko	0,09	0,84	Švýcarsko	0,17	0,72
Tur+Ira	0,01	0,82	Tur+Ira	0,02	0,59
Ukrajina	-0,07	0,80	Ukrajina	0,08	0,59

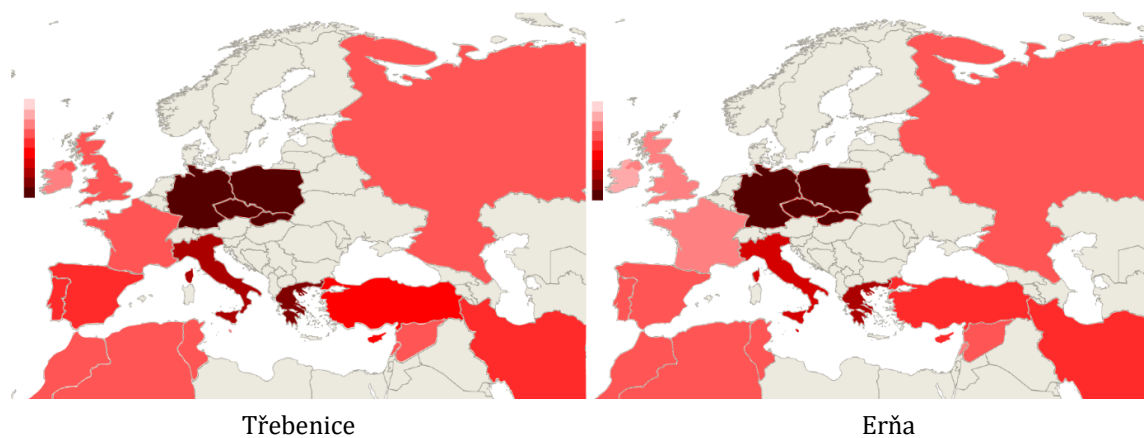
Tab 9: Výsledek  $\Phi_{ST}$  a Snn statistiky pro druh *P. pygmaeus*;  $\Phi_{ST}$  – fixační index, nabývá hodnot 0 až 1, 0 – kompletní sdílení genetické informace mezi dvěma populacemi, probíhá genový tok, 1 – neprobíhá genový tok, populace je tzv. fixovaná; Snn – statistika nejbližšího souseda, nabývá hodnot 0,5 až 1; 0,5 – jedná se o dvě totožné panmiktické populace, 1 – dvě vysoce diferencované populace

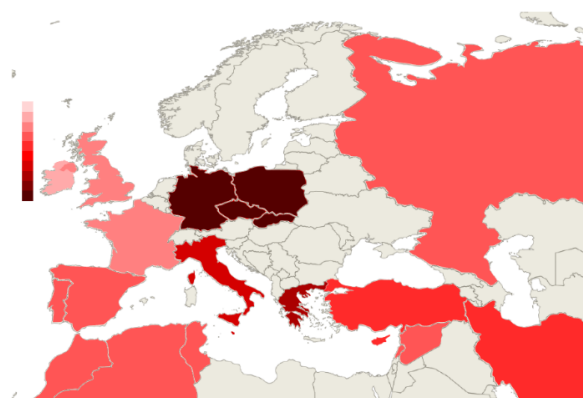


Obr 9: Přenesení výsledků  $\Phi_{ST}$  statistiky pro druh *P. pygmaeus* do mapy; genetická distance je znázorněna od tmavě rudé ( $\Phi_{ST} = 0$ ) po bílou ( $\Phi_{ST} = 1$ ), barevná škála je nastavena od 0 do 1 se změnou barvy po 0,1

Třebenice			Erňa			Huda lui Papară		
<i>P. pipistrellus</i>	$\Phi_{ST}$	Snn	<i>P. pipistrellus</i>	$\Phi_{ST}$	Snn	<i>P. pipistrellus</i>	$\Phi_{ST}$	Snn
Ang+SevIR	0,67	0,85	Ang+SevIR	0,76	1,00	Ang+SevIR	0,75	1,00
Česká republika	0,01	0,55	Česká republika	0,02	0,60	Česká republika	0,04	0,65
Francie	0,68	0,89	Francie	0,76	1,00	Francie	0,75	1,00
Německo	0,00	0,74	Německo	0,00	0,66	Německo	0,03	0,70
Írán	0,50	0,98	Írán	0,57	0,97	Írán	0,57	0,97
Irsko	0,77	0,92	Irsko	0,86	1,00	Irsko	0,85	1,00
Ita+Mal+Sic+Kor	0,30	0,86	Ita+Mal+Sic+Kor	0,34	1,00	Ita+Mal+Sic+Kor	0,38	1,00
Libanon	0,63	1,00	Libanon	0,70	1,00	Libanon	0,69	1,00
Mar+Tun+Alž	0,65	1,00	Mar+Tun+Alž	0,67	1,00	Mar+Tun+Alž	0,67	1,00
Polsko	-0,04	0,91	Polsko	0,10	0,93	Polsko	0,00	0,92
Řecko	0,15	0,91	Řecko	0,22	0,88	Řecko	0,24	0,89
Rusko	0,62	0,99	Rusko	0,69	1,00	Rusko	0,69	1,00
Špa+Por	0,59	0,96	Špa+Por	0,67	1,00	Špa+Por	0,67	1,00
Slovensko	0,00	0,62	Slovensko	0,00	0,58	Slovensko	0,00	0,45
Sýrie	0,60	1,00	Sýrie	0,65	1,00	Sýrie	0,65	1,00
Tur+Kyp	0,47	1,00	Tur+Kyp	0,53	1,00	Tur+Kyp	0,53	1,00

Tab 10: Výsledek  $\Phi_{ST}$  a Snn statistiky pro druh *P. pipistrellus*; definice  $\Phi_{ST}$  a Snn a shoduje s přechozím případem



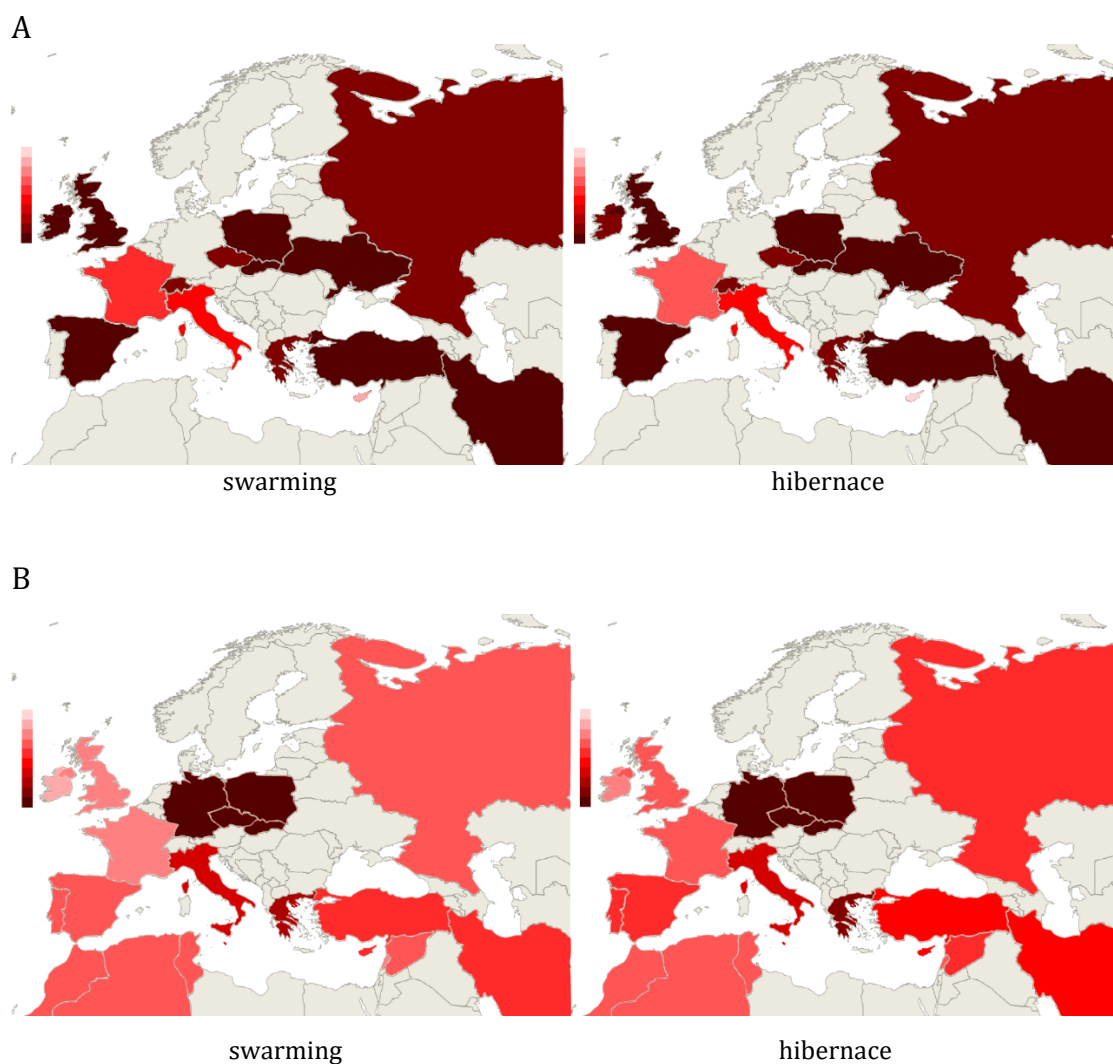


Huda lui Papară

Obr 10: Přenesení výsledků  $\Phi_{ST}$  statistiky pro druh *P. pipistrellus* do mapy; genetická distance je znázorněna od tmavě rudé ( $\Phi_{ST} = 0$ ) po bílou ( $\Phi_{ST} = 1$ ), barevná škála je nastavena od 0 do 1 se změnou barvy po 0,1

<i>P. pygmaeus swarming</i>			<i>P. pygmaeus hibernace</i>			<i>P. pipistrellus swarming</i>			<i>P. pipistrellus hibernace</i>		
země	$\Phi_{ST}$	Snn	země	$\Phi_{ST}$	Snn	země	$\Phi_{ST}$	Snn	země	$\Phi_{ST}$	Snn
Ang+SevIR	0,04	0,53	Ang+SevIR	0,05	0,46	Ang+SevIR	0,76	1,00	Ang+SevIR	0,63	0,81
ČR	0,14	0,66	ČR	0,16	0,64	ČR	0,01	0,52	ČR	0,01	0,6
Fra	0,52	1,00	Fra	0,60	1,00	Fra	0,76	1,00	Fra	0,64	0,87
Ire	0,07	0,83	Ire	0,10	0,88	Něm	0,00	0,48	Něm	0,01	0,73
Ita+Kor	0,43	0,95	Ita+Kor	0,47	0,95	Ira	0,57	0,95	Ira	0,47	0,98
Kyp	0,87	1,00	Kyp	0,90	1,00	Ire	0,83	1,00	Ire	0,73	0,89
Pol	0,03	0,51	Pol	0,06	0,46	Ita+Mal+Sic+Kor	0,38	1,00	Ita+Mal+Sic+Kor	0,30	0,83
Řec	0,12	0,63	Řec	0,14	0,67	Lib	0,70	1,00	Lib	0,61	1,00
Rus	0,12	0,72	Rus	0,13	0,68	Mar+Tun+Alž	0,68	1,00	Mar+Tun+Alž	0,63	1,00
Špa	0,00	0,71	Špa	0,00	0,60	Pol	-0,02	0,74	Pol	-0,04	0,88
Svk	0,03	0,5	Svk	-0,02	0,41	Řec	0,22	0,84	Řec	0,13	0,90
Švý	0,16	0,64	Švý	0,18	0,57	Rus	0,69	1,00	Rus	0,59	0,99
Tur+Ira	0,01	0,53	Tur+Ira	0,03	0,50	Špa+Por	0,67	1,00	Špa+Por	0,56	0,95
Ukr	0,08	0,49	Ukr	0,09	0,50	Svk	-0,02	0,36	Svk	0,01	0,71
						Syr	0,66	1,00	Syr	0,58	1,00
						Tur+Kyp	0,52	1,00	Tur+Kyp	0,44	1,00

Tab. 11: Výsledek  $\Phi_{ST}$  a Snn statistiky pro oba druhy z lokality Třebeňovice během swarmingu a hibernace



Obr. 11: Přenesení výsledků  $\Phi_{ST}$  statistiky pro druhy *P. pygmaeus* (A) a *P. pipistrellus* (B) do mapy; genetická distance je znázorněna od tmavě rudé ( $\Phi_{ST} = 0$ ) po bílou ( $\Phi_{ST} = 1$ ), barevná škála je nastavena od 0 do 1 se změnou barvy po 0,1

#### 4.1.2 Popisné charakteristiky genetické variability

Pro jednotlivé kolonie bylo vytvořeno zvlášť pět alignmentů. Pro každou kolonii pak byly spočítány v programu Dna SP statistiky vypsané v tabulce 12. Hodnoty vyznačené oranžově jsou signifikantní.

Populace	$N_s$	$S$	$N_h$	$h$	$\pi$	$k$	Fu & Li's $F^*$	Fu & Li's $D^*$	Fu's $F_S$	Tajima's $D$	exp ( $S/k$ )
<i>P. pygmaeus</i> Sv. Jan pod Skalou	34	16	16	0,822	0,00615	1,727	-3,18153	-3,10804	-12,417	-1,8512	9,265
<i>P. pygmaeus</i> Třebenice	9	4	4	0,583	0,00316	0,889	-1,94803	-1,79883	-1,283	-1,60974	10,124
<i>P. pipistrellus</i> Třebenice	32	40	22	0,964	0,02053	5,688	-0,9488	-0,37663	-10,685	-1,66109	7,032
<i>P. pipistrellus</i> Erňa	27	22	19	0,957	0,0118	3,316	-1,68402	-1,40372	-13,723	-1,50458	6,634
<i>P. pipistrellus</i> Huda lui Paparã	24	26	21	0,989	0,0131	3,681	-1,88021	-1,53886	-19,792	-1,75832	7,063

Tab. 12: Popisné charakteristiky genetické variability;  $N_s$  – počet sekvencí,  $S$  – počet variabilních míst,  $N_h$  – počet haplotypů,  $h$  – diverzita haplotypů,  $\pi$  – diverzita nukleotidů,  $k$  – průměr počtu rozdílů mezi páry nukleotidů, Fu & Li's  $F^*$ , Fu & Li's  $D^*$ , Fu's  $F_S$ , Tajima's  $D$  statistiky, exp – expanzní koeficient

Nejsilnější signál pro populační růst byl detekován pro kolonii z lokality Svätý Jan pod Skalou u druhu *P. pygmaeus* – signifikantní negativní hodnoty testů neutrality. Signifikantní negativní hodnotu měl i výsledek Tajima's  $D$  statistiky, což značí nízkou frekvenci polymorfismu indukující růst populace.

Pro oba druhy netopýrů z lokality Třebenice byly spočítány statistiky vypsané výše se zaměřením na rozdíl mezi létem a zimou. V případě hibernující kolonie druhu *P. pygmaeus* se povedlo získat sekvence pouze pro tři jedince a minimální počet pro výpočet statistik jsou sekvence čtyři. Z tohoto důvodu nejsou výpočty pro tuto kolonii uvedeny.

Populace	$N_s$	$S$	$N_h$	$h$	$\pi$	$k$	Fu & Li's $F^*$	Fu & Li's $D^*$	Fu's $F_S$	Tajima's $D$	exp ( $S/k$ )
<i>P. pygmaeus</i> swarming	5	3	3	0,7	0,00427	1,2	-1,05189	-1,04849	-0,186	-1,04849	2,5
<i>P. pygmaeus</i> hibernace	3	nelze spočítat									
<i>P. pipistrellus</i> swarming	10	11	9	0,978	0,01123	3,156	-0,71948	-0,5723	-5,318	-0,84388	3,485
<i>P. pipistrellus</i> hibernace	22	38	16	0,961	0,02443	6,766	-1,08061	-0,67267	-5,052	-1,49696	5,616

Tab. 13: Popisné charakteristiky genetické variability pro oba druhy v období swarmingu a hibernace v Třebenicích;  $N_s$  – počet sekvencí,  $S$  – počet variabilních míst,  $N_h$  – počet haplotypů,  $h$  – diverzita haplotypů,  $\pi$  – diverzita nukleotidů,  $k$  – průměr počtu rozdílů mezi páry nukleotidů, Fu & Li's  $F^*$ , Fu & Li's  $D^*$ , Fu's  $F_S$ , Tajima's  $D$  statistiky, exp – expanzní koeficient

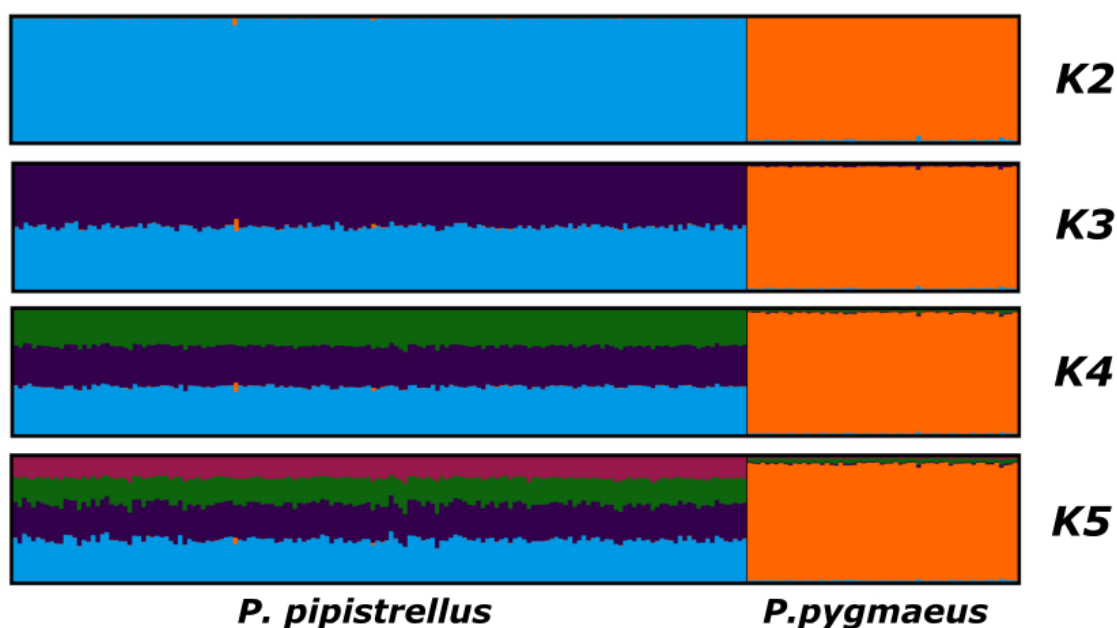


## 4.2 Analýza jaderných mikrosatelitů

Z 229 vzorků se amplifikace jaderných mikrosatelitů povedla u 219 vzorků, což činí přibližně 95% úspěšnost. Amplifikace některých lokusů byla problémovější a z některých analýz s menším počtem jedinců tak musely být některé lokusy vyřazeny.

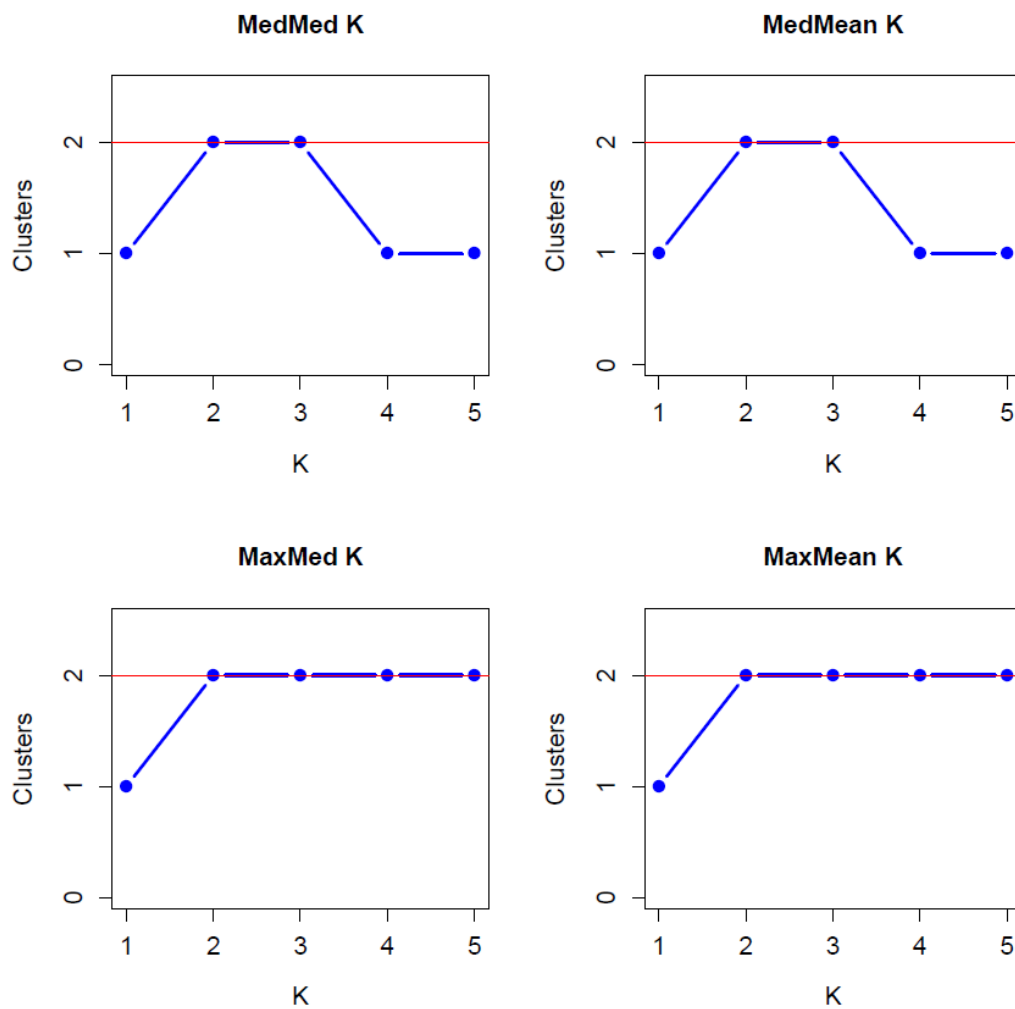
### 4.2.1 Bayesiánská analýza

Bayesiánská klastrovací procedura byla provedena v programu Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Nejprve byla spočítána pro oba druhy dohromady, celkem 219 jedinců (Obr. 12). Vzorky byly jasně rozděleny na dva druhy a populace druhu *P. pygmaeus* vykazovala velkou dávku uniformity. Analýza byla na základě předchozího výsledku spočítána pro každý druh zvlášť (Obr. 14, 16).

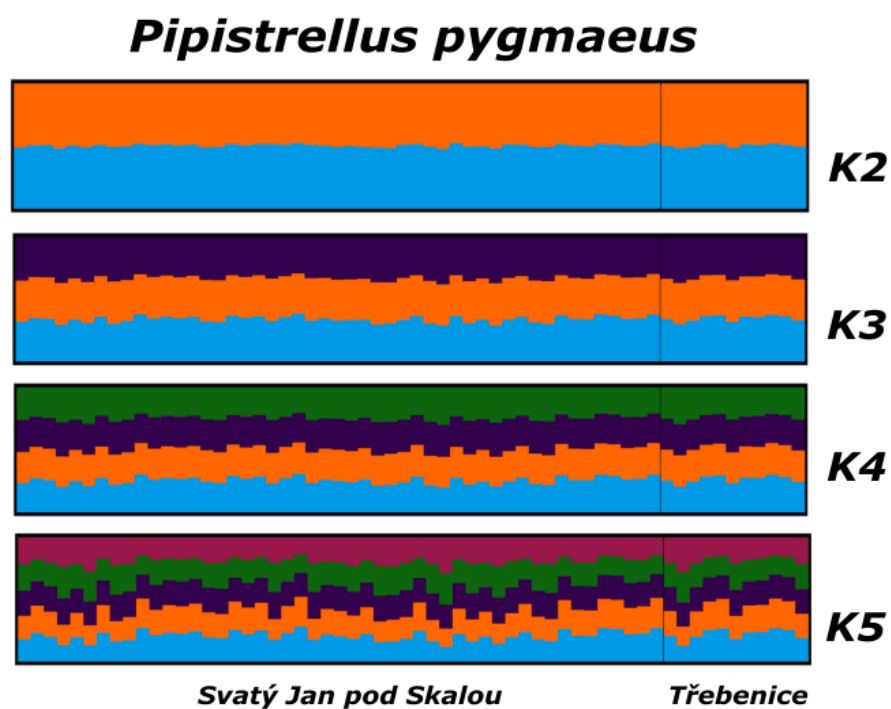


Obr. 12: Analýza v programu Structure 2.3.4 pro oba druhy dohromady, 10 simulací, K = 1 – 5, délka Length of burning period 10 000, počet MCMC opakování 100 000

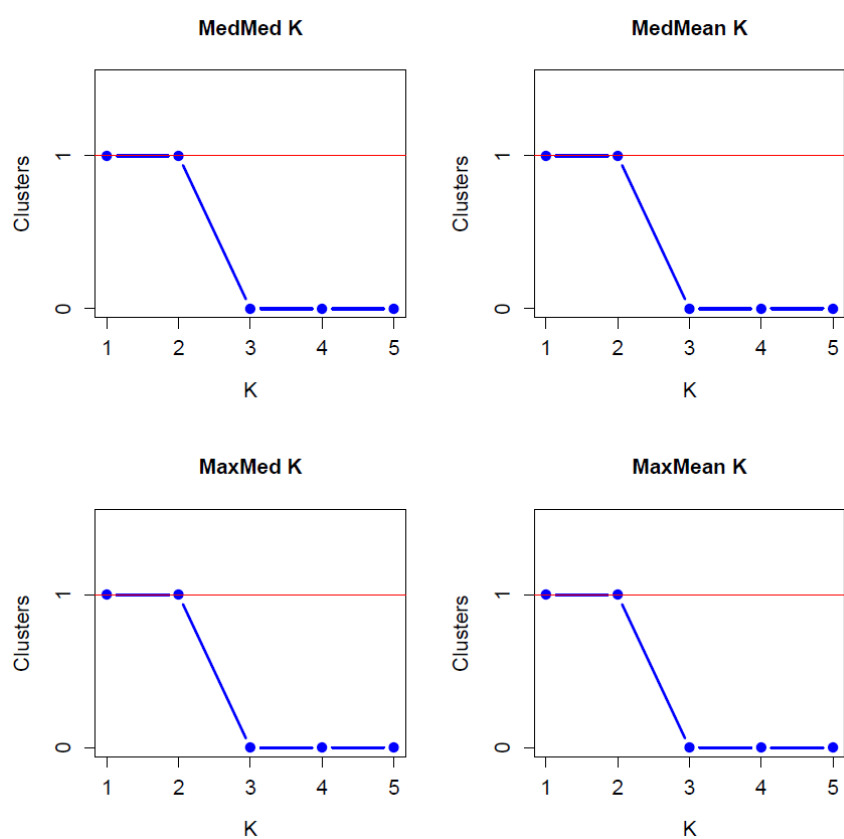
Pro druh *P. pygmaeus* byla analýza spočítána pro 59 jedinců s nadefinováním dvou populací podle lokality nálezů, stejně tak pro *P. pipistrellus* (160 jedinců rozdělených do tří populací).



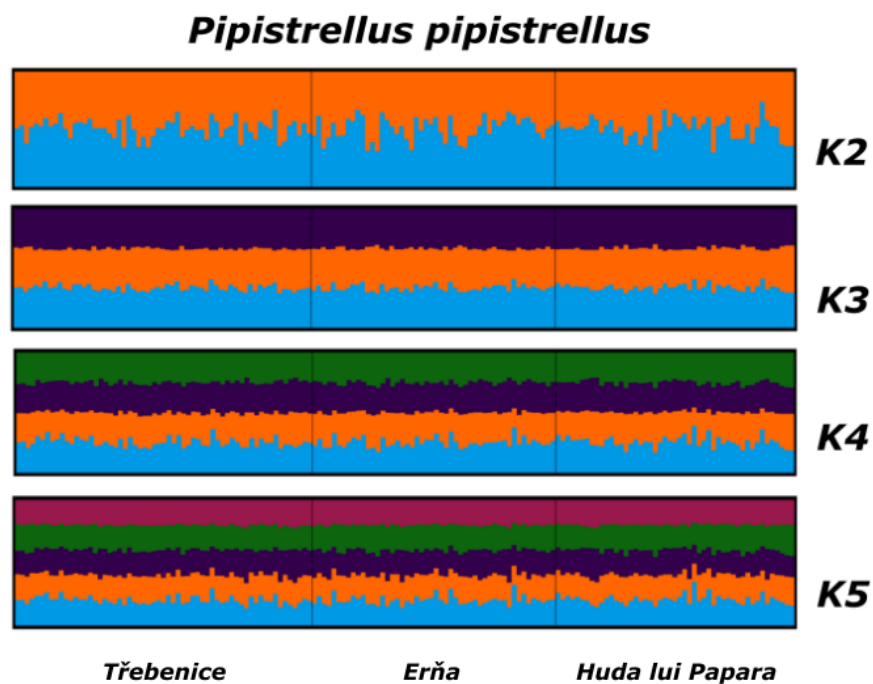
Obr. 13: Grafický výstup programu Structure Selector zobrazující nejlepší K pro 219 jedinců populací *P. pipistrellus* a *P. pygmaeus* (Threshold=0,5), optimální K je vyznačeno červenou linkou



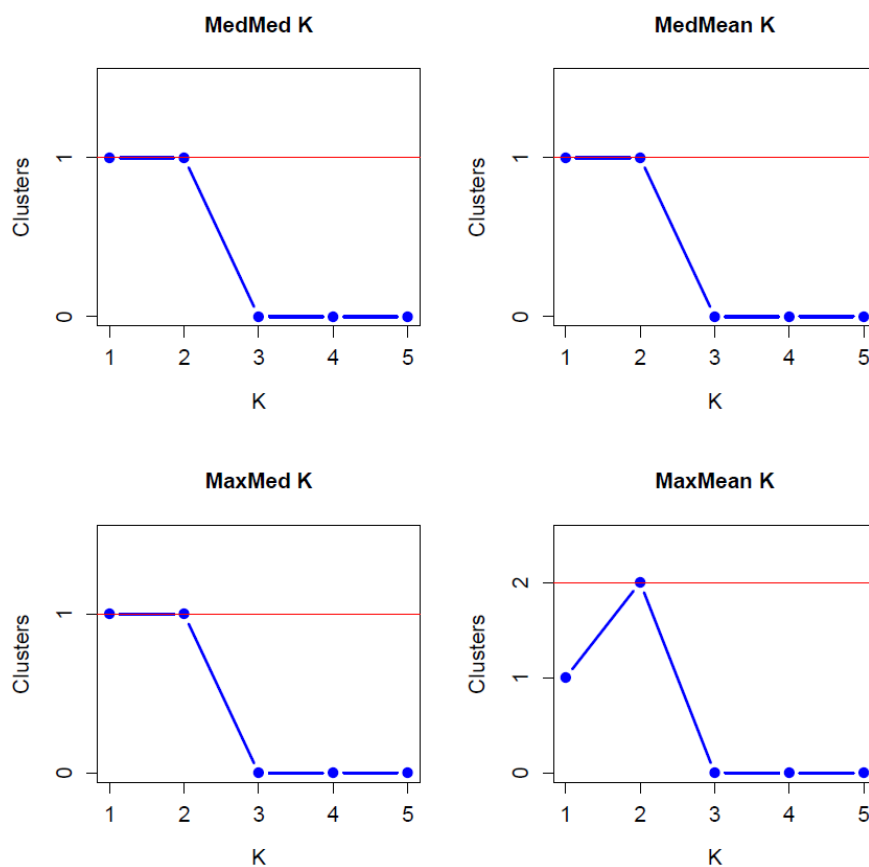
Obr. 14: Analýza v programu Structure 2.3.4 pro *Pipistrellus pygmaeus*, 10 simulací,  $K = 1 - 5$ , Length of burning period 100 000, MCMC opakování 1 000 000



Obr. 15: Grafický výstup programu Structure Selector zobrazující nejlepší  $K$  pro 59 jedinců druhu *P. pygmaeus* (Threshold=0,5), optimální  $K$  je vyznačeno červenou linkou



Obr. 16: Analýza v programu Structure 2.3.4 pro *Pipistrellus pipistrellus*, K = 1 – 5, Length of burning period 100 000, MCMC opakování 1 000 000



Obr. 17: Grafický výstup programu Structure Selector zobrazující nejlepší K pro 160 jedinců druhu *P. pipistrellus* (Threshold=0,5), optimální K je vyznačeno červenou linkou

#### 4.2.2 Odhad frekvence nulových alel

Odhad frekvence nulových alel byl spočítán programem FREENA (Chapuis & Estoup, 2007) zvlášť pro oba druhy rozdělené na jednotlivé populace s 95% intervalem spolehlivosti a počtem 1000 opakování. Frekvence výskytu nulových alel byla stanovena následovně: zanedbatelná ( $x < 0,05$ ), střední ( $0,05 \leq x < 0,20$ ), vysoká ( $x \geq 0,20$ ) (Chapuis & Estoup, 2007). Vysoká pravděpodobnost výskytu nulových alel vyšla pro lokus Ppip04 u populace druhu *P. pygmaeus* z lokality Svatý Jan pod Skalou a pro lokus NnP217 u populace druhu *P. pipistrellus* z lokality Třebenice.

V případě populace z jeskyně Erňa nebylo možné odhad spočítat pro lokus EF4 z důvodu, že se při amplifikaci tohoto lokusu v této populaci nepovedla amplifikace ani u jednoho zvířete.

Lokalita	Lokus	Odhad	Lokalita	Lokus	Odhad
Sv. Jan pod Skalou	EF1	0,08690	Třebenice	EF1	0,04762
	EF4	0,18660		EF4	0,00000
	Paur05	0,01244		Paur05	0,00000
	NnP217	0,14087		NnP217	0,04770
	NnP219	0,07629		NnP219	0,07946
	Ppip01	0,05380		Ppip01	0,00000
	Ppip06	0,00000		Ppip06	0,08610
	Ppip04	0,22521		Ppip04	0,03704
	Ppip02	0,00198		Ppip02	0,05793

Tab. 14: Odhad pravděpodobnosti výskytu nulových alel v programu FreeNA pro 2 populace druhu *P. pygmaeus*; zanedbatelná ( $x < 0,05$ ), střední ( $0,05 \leq x < 0,20$ ), vysoká ( $x \geq 0,20$ ); (Chapuis & Estoup, 2007)

Lokalita	Lokus	Odhad	Lokalita	Lokus	Odhad	Lokalita	Lokus	Odhad
Třebenice	EF1	0,00000	Erňa	EF1	0,04536	Huda lui Papară	EF1	0,00005
	EF4	0,16836		EF4	-		EF4	0,00100
	Paur05	0,17187		Paur05	0,19728		Paur05	0,12987
	NnP217	0,21180		NnP217	0,10826		NnP217	0,07231
	NnP219	0,03147		NnP219	0,01616		NnP219	0,03742
	Ppip01	0,02040		Ppip01	0,00000		Ppip01	0,06395
	Ppip06	0,00000		Ppip06	0,04427		Ppip06	0,00017
	Ppip04	0,16647		Ppip04	0,11395		Ppip04	0,10325
	Ppip02	0,00000		Ppip02	0,00776		Ppip02	0,00003

Tab. 15: Odhad frekvence nulových alel pro 3 populace druhu *P. pipistrellus*

S oběma lokusy (Ppip04 u populace ze Svatého Jana a NnP217 u třebenické populace) nicméně další statistiky spočítány byly z toho důvodu, že vzorek jedinců je u obou populací poměrně malý a vysoká frekvence nulových alel může být způsobena právě nízkým počtem jedinců.

#### 4.2.3 Genetická diverzita

Po spočtení odhadu frekvence nulových alel byly pro každou populaci zvlášť spočteny charakteristiky genetické diverzity. Statistiky pro populaci z jeskyně Erňa a Huda lui Paparã byly spočteny pouze pro osm lokusů. Lokus EF4 musel být v obou případech vyloučen, u jedinců z jeskyně Erňa se amplifikace nepovedla ani u jednoho zvířete, u jedinců z jeskyně Huda lui Paparã se pak povedla pouze u jediného zvířete.

Populace	$N_m$	GD	A	AS	AR
<i>P. pygmaeus</i> Sv. Jan pod Skalou	49	0,84	10,9	98	6,9
<i>P. pygmaeus</i> Třebenice	10	0,78	6,9	62	6,17
<i>P. pipistrellus</i> Třebenice	61	0,83	12,7	114	11,9
<i>P. pipistrellus</i> Erňa	50	0,82	11,9	95	11,3
<i>P. pipistrellus</i> Huda lui Paparã	49	0,83	12,3	98	11,6

Tab. 16: Popisné charakteristiky genetické diverzity pro oba druhy;  $N_m$  – počet genotypovaných jedinců, GD – průměrná genetická diverzita na lokus, A – průměr počtu alel na lokus, AS – počet alel všech lokusů dohromady, AR – průměrné alelické bohatství

Charakteristiky genetické diverzity byly spočteny zvlášť i pro oba druhy netopýrů z lokality Třebenice po rozdělení na jedince z období swarmingu a hibernace. U swarmujících jedinců druhu *P. pipistrellus* musel být z výpočtů vyrazen lokus EF4, jelikož se jeho amplifikace nezdařila u žádného zvířete.

Populace	$N_m$	GD	$A$	AS	AR
<i>P. pygmaeus</i> swarming	5	0,7	4,2	38	2,66
<i>P. pygmaeus</i> hibernace	5	0,78	4,6	41	4,21
<i>P. pipistrellus</i> swarming	10	0,86	6,6	54	6,49
<i>P. pipistrellus</i> hibernace	51	0,81	12,2	110	11,64

Tab. 17: Popisné charakteristiky genetické diverzity pro populace obou druhů na lokalitě Třebenic ve dvou obdobích;  $N_m$  – počet genotypovaných jedinců, GD – průměrná genetická diverzita na lokus,  $A$  – průměr počtu alel na lokus, AS – počet alel všech lokusů dohromady, AR – průměrné alelické bohatství

## 5. DISKUZE

### 5.1 Genetické markery

K amplifikaci byla zvolena kontrolní oblast mitochondriální DNA D-loop, která je známá svou vysokou mutační rychlostí u zvířat a je tak pro studie populační genetiky a fylogeografie (Hulva et al., 2010) vhodnějším markerem než cytochrom *b*, využívaný spíše ve fylogenetických studiích (Hulva et al., 2004). Navíc je tato oblast využívána v mnoha recentních studiích a umožňuje nám tak naše data porovnat s daty již publikovanými. Biparentálně dědičné a rychle mutující mikrosatelity jsou vhodným doplněním populačních studií reflektující jadernou mikroevoluci, nicméně vzhledem k metodice používané při fragmentační analýze neprodukují univerzální data, což limituje srovnání s publikovanými studiemi.

### 5.2 Hybridizace a introgrese

V rámci zkoumaných hibernujících populací byly zjištěny oba kryptické druhy, *P. pipistrellus* i *P. pygmaeus*. Porovnáním mitochondriálních i jaderných dat nebyl objeven žádný cytonukleární konflikt. U žádného jedince nebyla během Bayesiánské klastrovací procedury nalezena žádná indicie admixture v jaderném genotypu. To naznačuje, že v rámci zkoumaného populačního vzorku pravděpodobně nedochází k recentní hybridizaci. Co se týče starší hybridizace, v případě nenalezení cytonukleárního konfliktu (mitochondrial capture) má použitý počet mikrosatelitových markerů ze statistického hlediska limity v odhalení případné hybridizace pravděpodobně omezené na detekci F1, F2 a B1 kategorií (Randi et al., 2014). Odhalení případných starších hybridizačních událostí bude vyžadovat genomický přístup.

Další otázkou je geografická variabilita v případných patternech hybridizace. Vzhledem k hypotéze o hybridizaci v severnějších částech areálu (Sztencel-Jabłonka & Bogdanowicz, 2012) bude do budoucna důležité navzorkovat i další masová zimoviště z jiných geografických oblastí.



### 5.3 Druhové složení zkoumaných hibernujících populací

V rámci této práce se povedla navzorkovat 3 zimoviště ve střední Evropě a jedno známé masové zimoviště z Rumunska. U většiny vzorků se jednalo o odběry tkáně z mrtvých jedinců v různém stádiu rozkladu, což bylo pravděpodobně příčinou toho, že ne vždy se povedla amplifikace DNA.

V našem případě byli u dvou z pěti populací zimních kolonií všichni získaní jedinci určeni jako *P. pipistrellus* a obě tyto populace byly součástí masových jeskynních zimovišť netopýrů v jeskyni Erňa na Slovensku (čítající meziletočně okolo 50 tisíc jedinců – Nusová et al., (2017)) a v jeskyni Huda lui Papară (čítající také desetitisíce jedinců – Nagy & Postawa, (2011)). Další kolonie byla nalezena v přepouštěcím tunelu vodního díla Slapy u vesnice Třebenice. Získaní jedinci z této kolonie byli převážně určeni jako příslušníci druhu *P. pipistrellus*, nicméně mezi nimi bylo nalezeno i několik jedinců *P. pygmaeus*. Tato kolonie je oproti výše zmíněným podstatně menší a čítá ročně mezi dvěma až čtyřmi tisíci jedinci (Hanzal & Kříž, 2017). Poslední kolonie pak byla nejzajímavější, jelikož všichni získaní jedinci byli určeni jako *P. pygmaeus*, jehož kolonie nejsou moc známé. Někdy mohou být jednotlivci *P. pygmaeus* nalezeni jako součást větší kolonie *P. pipistrellus* (Kaňuch et al., 2010), takové nálezy jsou referovány z České republiky z lokality Nový Hrádek (Bartoničková, Reiter, & Bartonička, 2016), z Polska (Wojtaszyn et al., 2004) a ze Slovinska nebo Rumunska, kde ale jedinci byli určeni jako příslušníci druhu *P. pygmaeus* pouze na základě odhadu pomocí morfologie (Petrinjak, 2010; Murariu & Gheorghiu, 2013). Oproti *P. pipistrellus* si *P. pygmaeus* vybírá k zimování menší prostory a před jeskyněmi dává spíše přednost různým šterbinám v budovách či stromům (Bryja et al., 2009), což nález této kolonie potvrdil – byla nalezena na půdě chaty v obci Svatý Jan pod Skalou a čítala okolo 600 jedinců *P. pygmaeus* a *P. pipistrellus*.

### 5.4 Třebenice – sezónní srovnání

Během swarmingu a následném vytváření zimních kolonií dochází ke kontaktu samic se samci, u kterých se předpokládá, že během letní samotářské fáze se mohou pohybovat na větší vzdálenosti než samice (Bryja et al., 2009) a může tak

docházet ke genovému toku na velké vzdálenosti a následnému vytváření kolonií složených z jedinců z různých oblastí.

Vltavským kaňonem vede jeden z důležitých migračních koridorů netopýrů a ptáků a když zde byl prováděn bioakustický monitoring druhu *Nyctalus lasiopterus*, byl zde při analyzování nahrávek z období swarmingu detekován velmi vysoký počet jedinců druhu *P. pipistrellus* a *P. pygmaeus* (viz Obr. 5 v kapitole 1.3) (Bartonička et al., 2019). Lokalita Třebenice je proto velmi vhodná ke studiu migratorního chování i interakcí mezi oběma druhy.

V rámci našich dat se kromě zimních kolonií *P. pipistrellus* a *P. pygmaeus* povedlo získat i vzorky obou druhů z lokality Třebenice z léta z období swarmingu a mohla se tedy porovnat situace ve složení populace v těchto dvou obdobích. Nebyl nicméně odhalen významný rozdíl ve variabilitě mitochondriálních ani jaderných markerů, což se dá interpretovat tak, že jedinci, kteří swarmují v blízkosti tohoto zimoviště na něm absolvují i hibernaci. Srovnání nicméně mohlo být ovlivněno malou velikostí vzorku z období swarmingu, pro podrobnější srovnání bude potřeba větší populační vzorek.

## 5.5 Fylogeografie hibernujících populací

Výsledný fylogenetický strom znázorňuje sesterskou pozici obou zkoumaných druhů a dobře odpovídá fylogenetickým hypotézám prezentovaných v předchozích studiích (Hulva et al., 2004, 2007, 2010; Boston et al., 2014).

Co se týče geografické distribuce variability, zatímco *P. pygmaeus* vykazuje homogenní populační strukturu v rámci téměř celé Evropy (a zkoumané hibernující populace značnou podobnost s většinou Evropy s výjimkou určité distance od apeninské a francouzské populace), *P. pipistrellus* vykazuje určitou geografickou strukturu a isolation by distance. Většina hibernujících jedinců spadá do středoevropského klastru, s výjimkou dvou jedinců z keltské a jednoho jedince ze západoevropské haploskupiny, zjištěných v Třebenicích. Toto zimoviště se tedy zřejmě nachází v oblasti kontaktní zóny výše zmíněných haploskupin a také potenciálně na rekolonizačním a migračním rozhraní. Analýza jaderných mikrosatelitů taktéž ukázala panmixii u obou druhů, což naznačuje, že samčí genový tok převládá nad samičí filopatrií u obou druhů.

Při srovnání haplotypového složení jednotlivých hibernujících populací *P. pipistrellus* a určení genetické vzdálenosti mezi každou populací a jednotlivými státy Evropy, ze kterých se povedlo získat data bylo zjištěno, že všechny tři populace netopýrů byly složeny z převážně střeoevropských haplotypů (zejména haplotypy popsané v České republice, na Slovensku, v Německu a Polsku), stejně tak jako i nejnižší genetická distance vůči populacím byla popsána právě u těchto států. Zároveň ale bylo v každé populaci popsáno alespoň 10 nových haplotypů, což v některých případech tvořilo téměř polovinu všech zpracovaných vzorků. To by mohlo naznačovat vznik stále nových drobných diferenciací mezi jednotlivými koloniemi a i přesto, že je genový tok mezi těmito zvířaty silný, jedná se pravděpodobně v případě *P. pipistrellus* žijícího ve střední Evropě o zvířata sedentárnější a genový tok tak neprobíhá na velké vzdálenosti. To bylo ostatně i zjištěno v mnoha kroužkovacích studiích, prováděných převážně v Německu, že střeoevropští pipistrelloidní netopýři žijí spíše v sedentárnějších populacích a pohybují se na vzdálenosti maximálně pár desítek kilometrů (Hutterer et al., 2005).

Zda jsou to ale zvířata opravdu sedentární či nikoliv, se z našeho populačního vzorku nedá určit zcela jednoznačně, protože zde může hrát roli i různá intenzita genového toku v odlišných oblastech, jako je to uvedeno v práci skupiny Racey et al., (2007) z Velké Británie, kde se jak *P. pipistrellus* tak *P. pygmaeus* v okrajové části areálu svého výskytu chovají mnohem více sedentárněji a jednotlivé populace jsou vzájemně mnohem více diferenciované než zvířata v práci Bryja et al., (2009) ze střední Evropy, kde se naopak oba druhy jeví jako poměrně migratorní a není u nich detekována žádná izolace vzdáleností (IBD). Podle Hulva et al., (2010) pak výsledek práce skupiny Bryja et al. může být způsoben tím, že zkoumaná oblast nepřesáhla vzdálenost 800 km a že limitem pro genový tok mezi populacemi a projevem IBD je vzdálenost zhruba 1000 km.

U *P. pygmaeus* byla situace poněkud odlišná. Kromě střeoevropských haplotypů se v obou koloniích vyskytovaly i haplotypy popsané například v Irsku, Rusku, na Ukrajině či v Řecku a stejně tak tomu odpovídal i výpočet genetické vzdálenosti mezi populacemi a jednotlivými zeměmi. Několik nových haplotypů bylo popsáno i v těchto populacích, ale jejich množství rozhodně nebylo tak vysoké jako v případě *P. pipistrellus*. I co se týče samotného porovnání sekvencí

*P. pipistrellus* a *P. pygmaeus* mezi sebou, tak u prvně zmíněného sekvence obsahují mnohem více mutací, často se jedná o mutace, které vznikly hluboko v minulosti a vyskytují se napříč téměř všemi jedinci. U *P. pygmaeus* jsou sekvence naopak mnohem uniformnější a mutací neobsahují zdaleka tolik.

Toto všechno by tak u *P. pygmaeus* mohlo naznačovat dva možné scénáře: 1) buď se jedná o mnohem více migratorní druh než v případě *P. pipistrellus* a probíhá tak mezi jednotlivými koloniemi genový tok na velké vzdálenosti a nebo 2) je příčinou mnohem recentnější kolonizace Evropy (cca před 0,25 miliony let, oproti tomu *P. pipistrellus* se do Evropy dostal zhruba před 0,8 miliony let) a tím pádem ještě nejsou vytvořeny tak velké odlišnosti v rámci jednotlivých kolonií nebo i zemí (Hulva et al., 2004).

Největší diverzita mezi haplotypy byla pro všechny populace druhu *P. pipistrellus*. V rámci těchto tří populací pak byla diverzita srovnatelná a lišila se jen nepatrně. Nejnížší haplotypová diverzita byla nalezena u populace *P. pygmaeus* z Třebenic, to ale může být dáno i velmi nízkým počtem jedinců (pouze 9). Nicméně i přesto, že haplotypová diverzita byla pro všechny populace *P. pipistrellus* a populaci *P. pygmaeus* z lokality Svatý Jan pod Skalou poměrně vysoká, tak nukleotidová diverzita byla, zejména pro *P. pygmaeus* ze Svatého Jana, velmi nízká, což naznačuje že i přesto, že haplotypů se v populaci vyskytuje mnoho, samotné rozdíly mezi nimi jsou pouze malé.

Výsledky testů neutrality a Tajima's D statistiky ukazují na silný populační růst pouze pro *P. pygmaeus* z klastru ze Svatého Jana pod Skalou, což by mohlo odpovídat výše popsané situaci, že *P. pygmaeus* kolonizoval Evropu mnohem později než *P. pipistrellus*, a tím pádem u něj populace stále roste. Expanzní koeficient byl nicméně poměrně vysoký u všech pěti zkoumaných populací, nejvyšší pak pro obě populace *P. pygmaeus*.

Další variantou, proč je genetická struktura obou druhů tak nízká by mohla být disperze jednoho z pohlaví. U temperátních druhů netopýrů je toto časté u samců, u samic se totiž projevuje silná filopatrie (například *Myotis nattereri* – Rivers et al., (2005), *Plecotus auritus* – Furmankiewicz & Altringham, (2007)). Ta je předpokládána i u pipistrelloidních netopýrů (Bryja et al., (2009); Hulva et al.,

(2010). Homogenní struktura jaderných dat u obou druhů zjištěná v prezentovaných datech připouští tuto hypotézu samčího genového toku.

Nicméně všeobecně se u obou druhů netopýrů jedná o poměrně nízkou úroveň genetické struktury, která může být způsobena právě buď možnou migrací, a tedy genovým tokem na velké vzdálenosti anebo disperzí alespoň jednoho z pohlaví. I přesto, že oba druhy jsou k migraci dobře přizpůsobení, co se týče jejich morfologických letových uzpůsobení (Norberg & Rayner, 1987), žádný přímý důkaz pravidelné migrace na dlouhou vzdálenost nemáme.

Možností, jak tuto problematiku dále studovat, je využití dalších genetických markerů s pohlavně vázanou dědičností (například Y chromozom, mitochondriální DNA) a jejich porovnání s autozomálními markery, což je případ naší studie. Přímou evidenci by mohly poskytnout další metody. Co se týče kroužkování, bohužel návratnost takových studií je velmi malá. V letech 1948 – 2000 bylo na území České republiky a na Slovensku okroužkováno skoro 8000 netopýrů a návratnost za těchto 52 let činila jen necelá tři procenta (Gaisler et al., 2003).

Větší potenciál mají moderní technologie využívající telemetrii. U tak malých zvířat jako jsou netopýři rodu *Pipistrellus* je však satelitní telemetrie, která je nejvhodnější pro studium dálkových přesunů, stále limitována velikostí transponderů. I zde však pokrok v technologiích slibuje progres. Další možností pro studium migračního chování je studium stabilních izotopů.

## 6. ZÁVĚR

Na základě našich dat se podařilo zmapovat situaci v několika středoevropských zimovištích netopýrů druhu *P. pipistrellus* a *P. pygmaeus*. Bylo zjištěno, že zimoviště *P. pipistrellus* jsou řádově mnohem početnější, a i typy zimovišť mezi oběma druhy se odlišují – *P. pipistrellus* dává přednost zimování v obrovských koloniích v jeskyních, zatímco *P. pygmaeus* zimuje v menších, skrytějších koloniích, často v různých štěrbinách budov.

Variabilita mezi jednotlivými populacemi *P. pipistrellus* je vyšší než u *P. pygmaeus*, obecně je však genetická variabilita ve srovnání s jinými druhy poměrně nízká, což značí silný genový tok u obou druhů. U *P. pygmaeus* by se podle získaných dat mohlo jednat o genový tok i na větší vzdálenosti než u *P. pipistrellus*, případně může být velmi nízká genetická variabilita zapříčiněna recentnější kolonizací Evropy, než je tomu u *P. pipistrellus*. Tomu by odpovídalo i zjištění silného populačního růstu právě u jedné z populací *P. pygmaeus*.

Na základě určení příslušnosti haplotypů k haploskupinám byla většina studovaných zvířat zařazena do středoevropské haploskupiny, nicméně byly objeveny dva vzorky z trebenického zimoviště spadající do keltské haploskupiny a jeden vzorek z téhož zimoviště spadající do západoevropské haploskupiny.

K zjištění dalších podrobností by tak měly být v budoucnu při studiu této problematiky zahrnuty širší geografické rámce, využity genomické markery a tato data by měla být doplněna přímým studiem migračního chování (např. pomocí telemetrie nebo stabilních izotopů).

## 7. Seznam literatury

- Ahlén, I., Baagøe, H. J., & Bach, L. (2009). Behavior of Scandinavian Bats during Migration and Foraging at Sea. *Journal of Mammalogy*, 90(6), 1318–1323.
- Amos, W., Hoffman, J. I., Frodsham, A., Zhang, L., Best, S., & Hill, A. V. S. (2007). Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes*, 7(1), 10–14.
- Barlow, K. E. (1997). The diets of two phonic types of the bat *Pipistrellus pipistrellus* in Britain. *Journal of Zoology*, 243(3), 597–609.
- Barlow, K. E., & Jones, G. (1997). Differences in songflight calls and social calls between two phonic types of the vespertilionid bat *Pipistrellus pipistrellus*. *Journal of Zoology*, 241(2), 315–324.
- Barlow, K. E., Jones, G., & Barratt, E. M. (1997). Can skull morphology be used to predict ecological relationships between bat species? A test using two cryptic species of pipistrelle. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 264(1388), 1675–1700.
- Barratt, E. M., Deaville, R., Burland, T. M., & Bruford, M. W. (1997). DNA answers the call of pipistrelle bat species, 387, 138–139.
- Bartonička, T., Miketová, N., & Hulva, P. (2019). High throughput bioacoustic monitoring and phenology of the greater noctule bat (*Nyctalus lasiopterus*) compared to other migratory species. *Acta Chiropterologica*, 21(1), 75–85.
- Bartonička, T., & Řehák, Z. (2004). Flight activity and habitat use of *Pipistrellus pygmaeus* in a floodplain forest. *Mammalia*, 68(4), 365–375.
- Bartoničková, L., Reiter, A., & Bartonička, T. (2016). Mating and Courtship Behaviour of Two Sibling Bat Species (*Pipistrellus pipistrellus*, *P. pygmaeus*) in the Vicinity of a Hibernaculum. *Acta Chiropterologica*, 18(2), 467–475.
- Boston, E. S. M., Puechmille, S. J., Clissmann, F., & Teeling, E. C. (2014). Further Evidence for Cryptic North-Western Refugia in Europe? Mitochondrial Phylogeography of the Sibling Species *Pipistrellus pipistrellus* and *Pipistrellus pygmaeus*. *Acta Chiropterologica*, 16(2), 263–277.
- Bryja, J., Kaňuch, P., Fornůstková, A., Bartonička, T., & Řehák, Z. (2009). Low population genetic structuring of two cryptic bat species suggests their migratory behaviour in continental Europe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 96(1), 103–114.
- Burland, T. M., Barratt, E. M., & Racey, P. A. (1998). Isolation and characterization of microsatellite loci in the brown long-eared bat, *Plecotus auritus*, and cross-species amplification within the family Vespertilionidae. *Molecular Ecology*, 7(7), 136–138.
- Burland, Tamsin M., Barratt, E. M., Beaumont, M. A., & Racey, P. A. (1999). Population genetic structure and gene flow in a gleaner bat, *Plecotus auritus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266(1422), 975–980.
- Burland, Tamsin M., & Worthington, W. (2001). Seeing in the dark: molecular approaches to the study of bat populations. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 76(3), 389–409.
- Castella, V., Ruedi, M., & Excoffier, L. (2001). Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *Journal of Evolutionary Biology*, 14(5), 708–720.
- Chapuis, M. P., & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), 621–631.

- Davidson-Watts, I., Walls, S., & Jones, G. (2006). Differential habitat selection by *Pipistrellus pipistrellus* and *Pipistrellus pygmaeus* identifies distinct conservation needs for cryptic species of echolocating bats. *Biological Conservation*, 133(1), 118–127.
- Deffontaine, V., Libois, R., Kotlík, P., Sommer, R., Nieberding, C., Paradis, E., ... Michaux, J. R. (2005). Beyond the Mediterranean peninsulas: Evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology*, 14(6), 1727–1739.
- Dubey, S., Zaitsev, M., Cosson, J. F., Abdukadier, A., & Vogel, P. (2006). Pliocene and Pleistocene diversification and multiple refugia in a Eurasian shrew (*Crocivura suaveolens* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38(3), 635–647.
- Edmonds, C. A., Lillie, A. S., & Cavalli-Sforza, L. L. (2004). Mutations arising in the wave front of an expanding population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(4), 975–979.
- Evin, A., Horáček, I., & Hulva, P. (2011). Phenotypic diversification and island evolution of pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus* group) in the Mediterranean region inferred from geometric morphometrics and molecular phylogenetics. *Journal of Biogeography*, 38(11), 2091–2105.
- Fornůšková, A., Petit, E. J., Bartonička, T., Kaňuch, P., Butet, A., Řehák, Z., & Bryja, J. (2014). Strong matrilineal structure in common pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus*) is associated with variability in echolocation calls. *Biological Journal of the Linnean Society*, 113(4), 1115–1125.
- Fumagalli, L., Taberlet, P., Favre, L., & Hausser, J. (1996). Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mtDNA control region of shrews. *Molecular Biology and Evolution*, 13/1(1), 31–46.
- Furmankiewicz, J., & Altringham, J. (2007). Genetic structure in a swarming brown long-eared bat (*Plecotus auritus*) population: Evidence for mating at swarming sites. *Conservation Genetics*, 8(4), 913–923.
- Gaisler, J., Hanák, V., Hanzal, V., & Jarský, V. (2003). Výsledky kroužkování netopýrů v České republice a na Slovensku, 1948 - 2000. *Vespertilio*, 7, 3–61.
- Gaisler, J., & Zima, J. (2018). Zoologie obratlovců, 3. revidované vydání.
- Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, 86(6), 1994–1995.
- Hallatschek, O., & Nelson, D. R. (2008). Gene surfing in expanding populations. *Theoretical Population Biology*, 73(1), 158–170.
- Hanzal, V., & Kříž, K. (2017). Masové zimoviště netopýra hvízdavého (*Pipistrellus pipistrellus*) v obtoko - vém kanálu vodního díla Slapy (Chiroptera: Vespertilionidae). *Lynx*, 48, 203–206.
- Harrison, R. G. (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4(1), 6–11.
- Herdina, A. N., Hulva, P., Horá, I., Benda, P., Mayer, C., & Metscher, B. D. (2014). MicroCT Imaging Reveals Morphometric Baculum Differences for Discriminating the Cryptic Species *Pipistrellus pipistrellus* and *P. pygmaeus*. *Acta Chiropterologica*, 16(1), 157–168.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907–913.
- Holderegger, R., & Thiel-Egenter, C. (2009). A discussion of different types of



- glacial refugia used in mountain biogeography and phylogeography. *Journal of Biogeography*, 36(3), 476–480.
- Hsü, K. J., Ryan, W. B. F., & Cita, M. B. (1973). Late Miocene Desiccation of the Mediterranean. *Nature Phys. Sci.*, 242, 232.
- Hudson, R. R. (2000). A New Statistic for Detecting Genetic Differentiation. *Genetics*, 155(4), 2011–2014.
- Hulva, P., Fornůšková, A., Chudárková, A., Evin, A., Allegrini, B., Benda, P., & Bryja, J. (2010). Mechanisms of radiation in a bat group from the genus *Pipistrellus* inferred by phylogeography, demography and population genetics. *Molecular Ecology*, 19(24), 5417–5431.
- Hulva, Pavel, Benda, P., Hanák, V., Evin, A., & Horáček, I. (2007). New mitochondrial lineages within the *Pipistrellus pipistrellus* complex from Mediterranean Europe. *Folia Zoologica*, 56(4), 378–388.
- Hulva, Pavel, Horáček, I., Strelkov, P. P., & Benda, P. (2004). Molecular architecture of *Pipistrellus pipistrellus*/*Pipistrellus pygmaeus* complex (Chiroptera: Vespertilionidae): Further cryptic species and Mediterranean origin of the divergence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(3), 1023–1035.
- Hutterer, R., Ivanova, T., Meyer-Cords, C., & Rodrigues, L. (2005). Bat migration in Europe. A review of banding data and literature.
- Jones, G., & van Parijs, S. M. (1993). Bimodal echolocation in pipistrelle bats: Are cryptic species present. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 251(1331), 119–125.
- Kaňuch, P., Fornůšková, A., Bartonička, T., Bryja, J., & Řehák, Z. (2010). Do two cryptic pipistrelle bat species differ in their autumn and winter roosting strategies within the range of sympatry? *Folia Zoologica*, 59(2), 102–107.
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2017). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, (July), 1–7.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-havas, S., Sturrock, S., Buxton, S., ... Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649.
- Koubínová, D., Irwin, N., Hulva, P., Koubek, P., & Zima, J. (2013). Hidden diversity in Senegalese bats and associated findings in the systematics of the family Vespertilionidae. *Frontiers in Zoology*, 10(48), 1–16.
- Krijgsman, W., Hilgen, F. J., Raffi, I., Sierro, F. J., & Wilson, D. S. (1999). Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. *Nature*, 400(August), 652–655.
- Li, Y.-L., & Liu, J.-X. (2017). STRUCTURE SELECTOR: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*, 18(1), 176–177.
- Mayer, F., Schlötterer, C., & Tautz, D. (2000). Polymorphic microsatellite loci in vespertilionid bats isolated from the noctule bat *Nyctalus noctula*. *Molecular Ecology*, 9(9), 2208–2212.
- Murariu, D., & Gheorghiu, V. (2013). Șura Mare cave (Romania), the most important known hibernating roost for *Pipistrellus pygmaeus* Leach, 1825 (Chiroptera: Vespertilionidae). *Travaux Du Muséum National d'Histoire Naturelle*, LIII, 329–338.
- Nagy, A. Z. L., & Szántó, L. (2003). The Occurrence of Hibernating *Pipistrellus*

- pipistrellus (Schreber , 1774) in Caves of the Carpathian Basin. *Acta Chiropterologica*, 5(1), 155–160.
- Nagy, Z. L., & Postawa, T. (2011). Seasonal and geographical distribution of cave-dwelling bats in Romania: implications for conservation. *Animal Conservation*, 14(1), 74–86.
- Nei, M. (1986). Definition and estimation of fixation indices. *Evolution*, 40(3), 643–645.
- Norberg, U. M., & Rayner, J. M. V. (1987). Ecological morphology and flight in bats (Mammalia; Chiroptera): wing adaptations, flight performance, foraging strategy and echolocation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 316(1179), 335–427.
- Nusová, G., Fulín, M., Uhrin, M., Uhrovič, D., & Kaňuch, P. (2019). Spatiotemporal pattern in the autumn invasion behaviour of the common pipistrelle , *Pipistrellus pipistrellus* : Review with a case study. *Mammalian Biology*, 97(7), 13–21.
- Nusová, G., Šemeláková, M., Paučulová, L., Uhrin, M., & Kaňuch, P. (2017). Haplotype diversity in common pipistrelle's mass hibernacula from central Europe. *Biologia (Poland)*, 72(5), 548–553.
- Park, K. J., Altringham, J. D., & Jones, G. (1996). Assortative roosting in the two phonic types of *Pipistrellus pipistrellus* during the mating season. *Proceedings of the Royal Society B*, 263(1376), 1495–1499.
- Pavlinić, I., Tvrtković, N., & Holcer, D. (2008). Morphological identification of the Soprano pipistrelle (*Pipistrellus pygmaeus* Leach, 1825) in Croatia. *Hystrix the Italian Journal of Mammalogy*, 19(1), 47–53.
- Petit, E., Balloux, F., & Goudet, J. (2006). Sex-Biased Dispersal in a Migratory Bat: a Characterization Using Sex-Specific Demographic Parameters. *Evolution*, 55(3), 635–640.
- Petit, E., & Mayer, F. (1999). Male dispersal in the noctule bat (*Nyctalus noctula*): where are the limits? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266(1430), 1717–1722.
- Petrinjak, A. (2010). First record of a larger hibernaculum of the Soprano pipistrelles *Pipistrellus pygmaeus* (Leach , 1825) in Slovenia. *Terenska Notica*, 61–62.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J.-M., Paetkau, D., Baudouin, L., & Estoup, A. (2004). GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, 95(6), 536–539.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- Racey, P. A., Barratt, E. M., Burland, T. M., Deaville, R., Gotelli, D., Jones, G., & Pierny, S. B. (2007). Microsatellite DNA polymorphism confirms reproductive isolation and reveals differences in population genetic structure of cryptic pipistrelle bat species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 90(3), 539–550.
- Ramos-Onsins, S. E., & Rozas, J. (2002). Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12), 2092–2100.
- Randi, E., Hulva, P., Fabbri, E., Galaverni, M., Galov, A., Kusak, J., ... Caniglia, R. (2014). Multilocus Detection of Wolf x Dog Hybridization in Italy , and Guidelines for Marker Selection. *PLoS ONE*, 9(1), 1–13.

- Rivers, N. M., Butlin, R. K., & Altringham, J. D. (2005). Genetic population structure of Natterer's bats explained by mating at swarming sites and philopatry. *Molecular Ecology*, 14(14), 4299–4312.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., & Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19(18), 2496–2497.
- Ruczyński, I., & Bogdanowicz, W. (2005). Roost Cavity Selection By *Nyctalus Noctula* and *N. Leisleri* (Vespertilionidae, Chiroptera) in Białowieża Primeval Forest, Eastern Poland. *Journal of Mammalogy*, 86(5), 921–930.
- Sachteleben, J., & von Helversen, O. (2006). Songflight behaviour and mating system of the pipistrelle bat (*Pipistrellus pipistrellus*) in an urban habitat. *Acta Chiropterologica*, 8(2), 391–401.
- Schmitt, T., Rákosi, L., Abadjiev, S., & Müller, P. (2007). Multiple differentiation centres of a non-Mediterranean butterfly species in south-eastern Europe. *Journal of Biogeography*, 34(6), 939–950.
- Shiel, C. B., & Fairley, J. S. (1999). Evening emergence of two nursery colonies of Leisler's bat (*Nyctalus leisleri*) in Ireland. *Journal of Zoology*, 247(4), 439–447.
- Sommer, R., & Benecke, N. (2004). Late- and Post-Glacial history of the Mustelidae in Europe. *Mammal Review*, 34(4), 249–284.
- Speakman, J. R., & Racey, P. A. (2006). Hibernation Ecology of the Pipistrelle Bat: Energy Expenditure, Water Requirements and Mass Loss, Implications for Survival and the Function of Winter Emergence Flights. *The Journal of Animal Ecology*, 58(3), 797.
- Stewart, J. R., & Lister, A. M. (2001). Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends In Ecology & Evolution*, 16(11), 608–613.
- Sztencel-Jabłonka, A., & Bogdanowicz, W. (2012). Population genetics study of common (*Pipistrellus pipistrellus*) and soprano (*Pipistrellus pygmaeus*) pipistrelle bats from central Europe suggests interspecific hybridization. *Canadian Journal of Zoology*, 90(10), 1251–1260.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596–1599.
- Ursenbacher, S., Carlsson, M., Helfer, V., Tegelström, H., & Fumagalli, L. (2006). Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology*, 15(11), 3425–3437.
- Voigt-Heucke, S. L., Zimmer, S., & Kipper, S. (2016). Does Interspecific Eavesdropping Promote Aerial Aggregations in European Pipistrelle Bats During Autumn? *Ethology*, 122(9), 745–757.
- Vonhof, M. J., Davis, C. S., Fenton, M. B., & Strobeck, C. (2002). Characterization of dinucleotide microsatellite loci in big brown bats (*Eptesicus fuscus*), and their use in other North American vespertilionid bats. *Molecular Ecology Notes*, 2(2), 167–169.
- Wojtaszyn, G., Rutkowski, T., Wiewióra, D., Ciechanowski, M., Stephan, W., Kepel, A., & Dziegielewska, M. (2004). Zimowe stanowiska karlika malutkiego *Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774) i karlika drobnego *Pipistrellus pygmaeus* (Leach, 1825) w północno-zachodniej Polsce. *Nietoperze*, 107–115.
- Worthington Wilmer, J., Moritz, C., Hall, L., & Toop, J. (1994). Extreme population

structuring in the threatened ghost bat, *Macroderma gigas*: evidence from mitochondrial DNA. *Proceedings of the Royal Society London*, 257(1349), 193–198.